



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Estudio de los microRNAs miR-126 y miR-375 como
potenciales biomarcadores en la prevención y
diagnóstico de diabetes tipo 2 en la población peruana**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga**

AUTOR

Carla BERNAL ESPINOZA

ASESOR

Mónica Yolanda PAREDES ANAYA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Bernal C. Estudio de los microRNAs miR-126 y miR-375 como potenciales biomarcadores en la prevención y diagnóstico de diabetes tipo 2 en la población peruana [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología; 2018.



Universidad Nacional Mayor De San Marcos
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

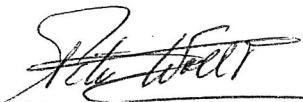
Siendo las 8:10 horas del 20 de diciembre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga de CARLA BERNAL ESPINOZA.

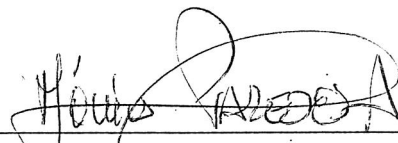
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 020-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: "ESTUDIO DE LOS microRNAs miR-126 y miR-375 COMO POTENCIALES BIOMARCADORES EN LA PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE DIABETES TIPO 2 EN LA POBLACIÓN PERUANA", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 10, calificativo: aprobado con mención honrosa ✓

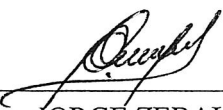
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga a CARLA BERNAL ESPINOZA y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 9:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 20 de diciembre de 2018.


Mg. PATRICIA WOLL TOSO
(PRESIDENTA)


Dra. MONICA PAREDES ANAYA
(ASESORA)


Blgo. JORGE ZEBALLOS ALVA
(MIEMBRO)


Blga. MARGARITA VELASQUEZ REINOSO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Poder finalizar este proyecto ha sido gracias al apoyo de muchas personas e instituciones que me alentaron, aconsejaron y brindaron su apoyo en diversos procesos y momentos. Por ello, mediante este espacio expreso mis agradecimientos.

Un agradecimiento especial a la Dra. Mónica Paredes, por permitirme ser parte de su laboratorio y hacer posible la ejecución de esta tesis. Su apoyo constante y guía a lo largo de todo este camino me han permitido apreciar la investigación y querer ser parte de ella. Gracias también por facilitarme los medios suficientes para realizar cada una de las actividades, sé que no fue fácil y usted lo hizo posible. Muchas gracias profesora.

Asimismo, al Dr. Wilser García por su orientación, recomendaciones y propuestas de cómo abordar esta tesis. Realmente su participación ha enriquecido este trabajo, y gracias por mostrarme de una manera fácil como realizar un análisis estadístico. Todo es posible con R, Wilser.

Al profesor Carlos Padilla, por ser un asesor más en este proyecto y guiarme en mis inicios en un laboratorio de biología molecular. Siempre disponible para un consejo y la asesoría que requería. Me alegra mucho de haber contado con su apoyo.

Al Dr. Jorge Calderón por permitirme estar presente en consultorio y conocer la realidad de un paciente con diabetes. Gracias por haberme enseñado la parte clínica de esta enfermedad, sin duda ha sido de gran ayuda.

Un agradecimiento especial a la profesora Martha Valdivia y Margarita Velásquez quienes me permitieron realizar parte de las actividades del proyecto en sus laboratorios. Es una suerte haber contado con su ayuda.

Agradecer también a compañeros y amigos del laboratorio Kriss, Orlando, Raisa y Eduardo, que algún momento me apoyaron y contribuyeron en la realización de esta tesis.

A mis amigos Kim, Ela, Wendy, Erick, Luis porque ustedes saben cómo es pasar por esto, gracias por sus consejos, sugerencias, mensajes de apoyo y por su amistad.

A todas las personas que he conocido en el transcurso de la ejecución de esta tesis y que han contribuido directa o indirectamente en la culminación de la misma.

Este trabajo de Investigación fue realizado en el Laboratorio de Genética de las Enfermedades Metabólicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en parte gracias al Financiamiento del Programa de promoción de tesis de pregrado - Año 2017 - Vicerrectorado de Investigación y Postgrado – UNMSM y al Financiamiento del Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT), a través del proyecto 401-PNICE-PIAP-2014: “Desarrollo de un kit diagnóstico preventivo para Diabetes tipo 2 en la población peruana”. Además del apoyo del Servicio de Endocrinología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

ABREVIATURAS

3' UTR	3' Untranslated region (Región 3' no traducida)
AGO	proteína argonauta
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	ADN complementario
Ct	Ciclo umbral
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dNTP	Desoxiribonucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
DT2	Diabetes tipo 2
GAA	Glucosa en ayuno alterada
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad)
IMC	Índice de masa corporal
IDF	Federación Internacional de Diabetes
mRNA	RNA mensajero

miRNA	microRNA
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young (Diabetes del adulto de inicio juvenil)
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
nt	Nucleótidos
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PTGO	Test de tolerancia oral a la glucosa
qPCR	PCR cuantitativo
RISC	RNA Induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por RNA)
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RT	Reverse transcripción (transcripción reversa)
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
T _m	Melting temperature (temperatura de disociación)
TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
VLDL	very low density lipoprotein (lipoproteína de muy baja densidad)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. Diabetes en el Perú	11
2.2. Biomarcadores de diabetes tipo 2.....	12
2.3. Rol de los miRNAs en la regulación génica.....	13
2.4 Diabetes tipo 2 y miRNAs circulantes.....	16
2.5. miR-126 y miR-375 en diabetes tipo 2.....	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
3.1. Hipótesis.....	21
3.2. Objetivos.....	21
3.2.1. General.....	21
3.2.2. Específicos.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Grupos de estudio y material biológico.....	22
4.1.1. Características de los grupos de estudio.....	22
4.1.1.1. Pacientes con diabetes tipo 2.....	22
4.1.1.2. Individuos con pre-diabetes.....	23
4.1.1.3. Control.....	23
4.2 Muestra biológica.....	23
4.3 Obtención de suero.....	24
4.4. Extracción de RNA.....	24
4.5. Diseño de cebadores.....	24
4.6. Poliadenilación y transcripción reversa.....	26
4.7. Curvas estándar en la cuantificación absoluta.....	27
4.8. PCR cuantitativo.....	27

4.9 Análisis Estadístico.....	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Grupos de estudio.....	31
5.2. Características antropométricas y bioquímicas.....	31
5.3. Perfiles de expresión.....	41
6. DISCUSIÓN.....	43
6.1 Factores de riesgo.....	43
6.2 Cuantificación de miRNAs.....	45
6.3 Expresión de miRNA-126 y miR-375.....	47
7. CONCLUSIONES.....	50
8. RECOMENDACIONES.....	51
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
10. ANEXOS.....	59
ANEXO 1. Características descriptivas de los grupos de estudio.....	59
ANEXO 2. Frecuencia relativa de individuos para la variable hipertensión.....	60
ANEXO 3. Frecuencia relativa de individuos para la variable Antecedente Familiares.....	61
ANEXO 4. Frecuencia relativa de individuos para la variable Índice de Masa Corporal.....	62
ANEXO 5. Ficha de datos.....	63
ANEXO 6. Consentimiento informado.....	64

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Biogénesis de los miRNAs.....	14
Figura 2. Ubicación de los cebadores para RT-qPCR específico de miRNA.....	25
Figura 3. Esquema de la qPCR específica de miRNA.....	27
Figura 4. Eficiencia de amplificación de miR-126 y miR-375.....	28
Figura 5. Distribución de la variable Índice de Masa Corporal (IMC).....	33
Figura 6. Distribución de la variable Circunferencia Abdominal (CA).....	34
Figura 7. Distribución de la variable Glucosa.....	35
Figura 8. Distribución de la variable Hemoglobina glicosilada (HbA1c).....	36
Figura 9. Distribución de la variable HDL.....	37
Figura 10. Distribución de la variable VLDL.....	38
Figura 11. Distribución de la variable Triglicéridos.....	39
Figura 12. Curvas de disociación para determinar la amplificación específica de los cebadores para miR-126 y miR-375. Fluorescencia (Derivate Reporter (-R)) vs Temperatura (°C).....	40
Figura 13. Nivel de expresión de miR-375.....	41
Figura 14. Nivel de expresión de miR-126.....	42
Tabla 1. Cebadores empleados en transcripción reversa y qPCR.....	25
Tabla 2. miRNAs sintéticos empleados para generar la curva estándar	26
Tabla 3. Descripción de las variables antropométricas y bioquímicas entre los grupos de estudio.....	32

RESUMEN

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad multifactorial considerada un problema de salud pública en el Perú. Su aumento rápido se relaciona con la falta de estrategias apropiadas para abordar el problema. Una detección temprana puede ayudar a prevenir futuras complicaciones y por ende una mejor calidad de vida. Diversos estudios han reportado la presencia de moléculas circulantes en la sangre que pueden ser útiles como marcadores de detección temprana, seguimiento y tratamiento de la DT2. Dentro de este conjunto de moléculas se encuentran los miRNAs, los cuales juegan un papel crucial en la patogénesis de la DT2 ya que regulan importantes vías metabólicas como la secreción de insulina y la homeóstasis de glucosa. En la presente tesis se estudió la expresión génica de los miRNAs miR-126 y miR-375 que, de acuerdo a la literatura, han sido estudiados para evaluar su potencial uso como marcadores de la DT2. Los miRNAs fueron obtenidos a partir de muestras de sangre y su expresión fue cuantificada por RT-qPCR. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el software R. Aunque no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre cualquiera de los miRNAs y los estados pre-diabetes y/o DT2, se encontró una tendencia de aumento en el nivel de expresión de miR-375 desde el grupo control al grupo DT2. Otras variables evaluadas debido a su estrecha relación con el desarrollo de DT2 tales como índice de masa corporal, circunferencia abdominal, concentración de glucosa en sangre, hemoglobina glicosilada, colesterol HDL, colesterol VLDL, triglicéridos, hipertensión y antecedentes familiares mostraron diferencias entre los grupos ($p < 0.05$).

Palabras Clave: Diabetes tipo 2, microRNA, qPCR

ABSTRACT

Type 2 diabetes (DT2) is a multifactorial disease considered a public health problem in Peru. Its rapid increase is related to the lack of appropriate strategies to address the problem. Early detection can help prevent future complications and therefore a better quality of life. Several studies have reported the presence of circulating molecules in the blood that may be useful as markers of early detection, monitoring and treatment of T2D. Within this set of molecules are the miRNAs, which play a crucial role in the pathogenesis of T2D since they regulate important metabolic pathways such as insulin secretion and glucose homeostasis. In this thesis we studied the gene expression of the miRNAs miR-126 and miR-375 that, according to the literature, have been studied to evaluate their potential use as markers of DT2. The miRNAs were obtained from blood samples and their expression was quantified by RT-qPCR. Statistical analyzes were carried out using the R software. Although no statistically significant association was found between any of the miRNAs and the pre-diabetes and/or DT2 states, a tendency of increase in the expression level of miR- was found. 375 from the control group to the DT2 group. Other variables evaluated due to their close relationship with the development of DT2 such as body mass index, abdominal circumference, blood glucose concentration, glycosylated hemoglobin, HDL cholesterol, VLDL cholesterol, triglycerides, hypertension and family history showed differences between the groups ($p < 0.05$).

Keywords: Type 2 diabetes, microRNA, qPCR.

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la diabetes tipo 2 (DT2) a nivel nacional es de 7% y existen aproximadamente 1.2 millones de peruanos que sufren de esta enfermedad; de los cuales, cerca de 1 millón aún no ha sido diagnosticado por lo que no ha recibido el tratamiento adecuado (Sausa, 2014). Según información del Ministerio de Salud (MINSA, 2015), alrededor del 8.2% de la población mayor de 18 años padece diabetes y la mitad de los afectados por esta enfermedad ignora que la padece.

La detección o diagnóstico clínico de esta enfermedad es posible mediante el uso de biomarcadores, parámetros biológicos que se pueden evaluar de manera objetiva (Abbasi, Stolk, & Bakker, 2014). Aunque existen distintos tipos de biomarcadores utilizados para el diagnóstico de DT2, entre los que se encuentran la concentración de lipoproteínas, ferritina y glucosa, estos parámetros séricos permiten la predicción del desarrollo de DT2 unos pocos años antes de su manifestación en individuos que ya presentan alteraciones metabólicas. Sin embargo, estos marcadores no son específicos de DT2 y no pueden utilizarse para evaluar la susceptibilidad de la enfermedad en la población (Guay & Regazzi, 2013).

El reciente descubrimiento de miRNAs estables en suero y plasma, protegidos de la actividad de RNAsas endógenas, ha permitido un gran avance en el campo de la biomedicina ya que abre la posibilidad de emplearlos como biomarcadores (Guay & Regazzi, 2013).

Por otro lado, de acuerdo con el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación, ALICIA (última revisión 10 de septiembre de 2018) no se hallan trabajos y/o investigaciones relacionadas al estudio de miRNAs ni su correlación/asociación con factores de riesgo (obesidad, edad, estilo de vida, etc.) en la población peruana.

Teniendo en cuenta esta realidad se considera de gran importancia el estudio realizado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Diabetes en el Perú

De acuerdo con la octava edición del *Diabetes Atlas* elaborado por la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation [IDF], 2017), se estima 425 millones de individuos con diabetes alrededor del mundo, lo equivalente al 8.8% de la población mundial. Asimismo, aproximadamente el 50% del total de personas con diabetes corresponde a individuos sin un diagnóstico de la enfermedad, lo que representa un problema global de salud pública. La DT2 representa aproximadamente el 95% de los casos de diabetes a nivel mundial. Esta enfermedad es más frecuente en personas mayores de 50 años así como en mujeres en comparación a varones (Seclen *et al.*, 2017).

La prevalencia de diabetes en el Perú para la población adulta entre 20 y 79 años de edad se estima en un 5.6% (IDF, 2017), una disminución aparente respecto al anterior *Diabetes Atlas* (International Diabetes Federation [IDF], 2015) donde la prevalencia estimada fue de 6.9%. Esta aparente disminución no significa realmente una menor prevalencia de diabetes en el Perú, tal como se ha estimado en varios países de América Central y del Sur (SACA), en realidad se debe al uso de nuevas fuentes de datos para estimar la prevalencia en estos países y que corresponden al periodo de enero 2015 a diciembre 2016.

En el Perú los estudios realizados en los últimos cinco años indican una prevalencia aproximada de 7% a nivel nacional (Seclen *et al.*, 2015; Bernabé-Ortiz *et al.*, 2016; Seclen *et al.*, 2017) y de 8.4% en Lima Metropolitana (Seclen *et al.*, 2015). Además, aproximadamente un 50% del total de individuos diabéticos, no está diagnosticado (Seclen *et al.*, 2015). Tras un seguimiento de aproximadamente cuatro años a individuos representativos de las tres regiones del país (costa, sierra y selva) se observa una asociación entre el desarrollo de DT2 y edad avanzada, obesidad y educación técnica/superior (Seclen *et al.*, 2017).

En el Perú se ha observado que la glucosa en ayuno alterada (GAA), un marcador sérico asociado al desarrollo de DT2, se encuentra en 22.4% de la población peruana y es mayor en personas que viven en la costa en comparación con las otras regiones (Seclen *et al.*, 2015). Estos datos nos indican el gran problema de salud pública que implica la diabetes y que en los últimos años se ha incrementado en las zonas urbanas (Bernabé-Ortiz *et al.*, 2016).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud en el Perú, el 2% del total de muertes en todas las edades es causado por diabetes. Es por ello que se debe prevenir la aparición de la enfermedad a través de políticas sanitarias, promoción de un estilo de vida saludable y búsqueda de biomarcadores para un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno.

2.2. Biomarcadores de diabetes tipo 2

Aunque niveles elevados de glucosa sanguínea se relacionan directamente con el desarrollo de diabetes, esta enfermedad en realidad tiene un origen complejo que involucra a múltiples factores tales como el sobrepeso, sedentarismo y factores genéticos.

La problemática de esta enfermedad, descrita anteriormente, lleva a la búsqueda de nuevos marcadores que permitan un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno evitando así complicaciones frecuentes en el país como la neuropatía que origina el pie diabético, la nefropatía diabética y la retinopatía diabética no proliferativa (Villena, 2016).

Actualmente se realizan varias pruebas bioquímicas para la detección precoz de la DT2, como son la glucosa plasmática en ayunas, glucosa plasmática a las 2 h luego de un test de tolerancia oral a la glucosa (PTGO) y la prueba de hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Care, 2017), además de las medidas antropométricas (Guay & Regazzi, 2013). Estas pruebas se suelen realizar a individuos que presentan

alteraciones metabólicas, no obstante, en el denominado estado pre-diabético ya existe una deficiencia en la función de las células β del páncreas (Jagannathan *et al.*, 2018).

Tanto los marcadores clásicos como colesterol, creatinina, lipoproteínas y triglicéridos; y los nuevos como incretinas, citokinas, adipokinas, proteína C reactiva, entre otros, no son específicos de DT2 (Guay & Regazzi, 2013), y en su mayoría solo reflejan la situación de una diabetes ya establecida.

El reciente descubrimiento de pequeños RNA, llamados microRNAs (miRNAs), que participan en varios procesos biológicos como proliferación, diferenciación, apoptosis, desarrollo celular, (Sebastiani *et al.*, 2017), entre otros, supone un gran interés en investigación con respecto al papel de estas moléculas en diversas patologías. Asimismo, su gran estabilidad en suero y/o plasma abre la posibilidad de emplearlos como biomarcadores en la prevención, diagnóstico, seguimiento y terapia génica de enfermedades como la DT2 (Guay & Regazzi, 2013; Raffort, Hinault, Dumortier, & Van Obberghen, 2015; Deiuliis, 2016; Sebastiani *et al.*, 2017).

2.3. Rol de los miRNAs en la regulación génica

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de cadena simple no codificantes que poseen un tamaño aproximado de 22 nucleótidos (Ha & Kim, 2014). Estas moléculas regulan la expresión de genes a nivel post transcripcional ya sea reprimiendo la traducción del RNA mensajero diana o promoviendo su degradación mediante la unión al extremo 3' UTR (Ying, Chang, & Lin, 2013), aunque, en algunos casos, puede unirse al extremo 5' UTR (Lee *et al.*, 2009) (Figura 1). Además, se ha observado que la alteración de los niveles de expresión de miRNAs repercute en el desarrollo de diversas patologías (Ha & Kim, 2014).

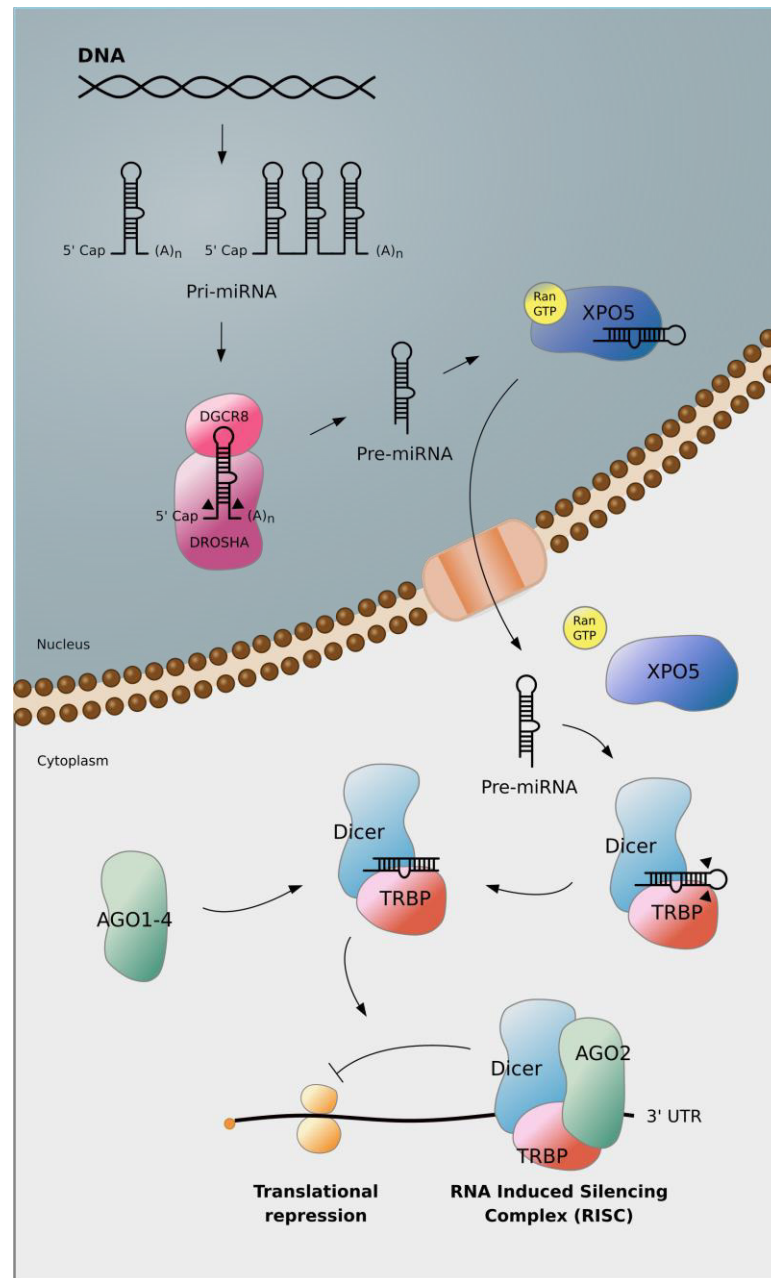


Figura 1. Biogénesis de los miRNAs.

Los pri-miRNA se transcriben mediante RNA polimerasa II y se escinden mediante Drosha y DGCR8. Este complejo reconoce la estructura de RNA bicatenario del pri-miRNA y lo escinde para liberar al pre-miRNA. Este pre-miRNA se exporta mediante exportina-5 hacia el citoplasma donde es procesado por Dicer junto a TRBP para formar un dúplex miR/miR* maduro. El dúplex miR/miR* se carga en el complejo RISC el cual elimina la hebra miR* para formar el RISC activo. Finalmente, se inhibe la traducción o induce la degradación del mRNA. (Adaptado: Melo & Melo, 2014).

La transcripción de los genes de miRNAs es llevada a cabo por las RNA polimerasa II o III (Melo & Melo, 2014) generando un transcrito primario de miRNA llamado pri-miRNA con una longitud entre 3 kb - 4 kb que consiste en una estructura tallo-lazo (*stem-loop*). Posteriormente una endonucleasa RNasa III, denominada Drosha, junto a la proteína DGCR8, proteína de unión a RNA de doble hebra, forman un complejo (denominado microprocesador) que corta al pri-miRNA para generar un precursor (pre-miRNA) de 60 a 70 nt aproximadamente que es exportado al citoplasma por la proteína exportina-5 dependiente de Ran-GTP. En el citoplasma, la endonucleasa RNasa III, Dicer, remueve el lazo (*loop*) para generar al miRNA maduro que es incorporado en la formación del complejo catalítico RISC. A través de este complejo se da la regulación génica, el cual está compuesto por Dicer, la proteína de unión a RNA en respuesta a trans-activación TRBP, que mejora la fidelidad de la escisión y que, a su vez, recluta a la proteína AGO que funciona como catalizador de RISC. Posteriormente, la proteína AGO selecciona la hebra madura del miRNA (miR) que guiará al complejo hacia el RNA mensajero diana. De esta forma la otra hebra denominada pasajera (miR*) es degradada (Figura 1) (Melo & Melo, 2014). Los miRNAs procedentes del extremo 3' o el extremo 5' del gen de miRNA se indican con un sufijo -3p o -5p, respectivamente.

Se predice que los miRNAs regulan aproximadamente el 60% de los genes codificantes. Un solo miRNA puede unirse a múltiples mRNA y estar implicado en diversas vías y procesos biológicos (Melo & Melo, 2014). Se sabe que el control de la biogénesis de los miRNAs involucra varias proteínas entre las que se encuentran proteínas supresoras de tumores y proteínas proto-oncogénicas (Bajan & Hutvagner, 2014). En el caso de la diabetes, la desregulación de los miRNAs afecta la función de las células β en el páncreas y/o la resistencia a la insulina (Feng, Xing, & Xie, 2016), además de los procesos celulares asociados tales como el metabolismo de lípidos y carbohidratos y las vías de señalización de la insulina y adiponectina (He *et al.*, 2017).

Así, basándose en la evidencia se llega a entender que el papel de los miRNAs es crucial para el desarrollo de diferentes procesos biológicos.

2.4 Diabetes tipo 2 y miRNAs circulantes

Las células están constantemente secretando miRNAs a través de microvesículas, exosomas, cuerpos apoptóticos y lipoproteínas (Higuchi *et al.*, 2015). Su presencia en diversos fluidos corporales como sangre, orina, leche materna, lagrimas, líquido seminal, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo (Raffort, Hinault, Dumortier, & Van Obberghen, 2015) permite proponerlos como potenciales biomarcadores de DT2 (Dehwah, Xu, & Huang, 2012; Guay & Regazzi 2013; Raffort, Hinault, Dumortier, & Van Obberghen, 2015; Deiuliis, 2016). En estudios *in vitro* la transferencia de miRNAs de células donadoras a células receptoras altera la expresión génica de las células receptoras, lo que sugiere también su potencial rol en la comunicación celular (Boon & Vickers, 2013).

Los miRNAs circulan por los diferentes fluidos dentro de vesículas derivadas de membrana y/o lipoproteínas, que los protegen de la acción de las RNasas circulantes, de esta forma pueden dirigirse y reconocer a RNA mensajeros en las células diana y así regular su expresión génica. Se ha observado que existen vías de señalización específicas con este fin (Boon & Vickers, 2013).

Existen varias consideraciones a tener en cuenta cuando se evalúa un potencial marcador biológico. Los miRNA poseen varias ventajas como su presencia y estabilidad en diversos fluidos corporales (Zubakov *et al.*, 2010; Park *et al.* 2009; Weber *et al.*, 2010), lo cual permite obtenerlos de una forma no invasiva, principalmente en suero y plasma (Mitchell *et al.*, 2008; Xu, Guo, Zhang, Chen, & Hu, 2016). La detección de los miRNAs se realiza mediante técnicas de biología molecular como secuenciamiento, microarreglos y PCR en tiempo real (de Planell-Saguer & Rodicio, 2013). De ellas, la PCR en tiempo real es usada para la validación de los

miRNAs que hayan sido identificados en un primer análisis de perfiles de expresión. Esta técnica no solo permite obtener resultados cuantitativos del nivel de expresión sino también la reproducción de los mismos (Etheridge, Lee, Hood, Galas, & Wang, 2011; Müller, 2012). De esta manera, los criterios mencionados permiten catalogarlos como marcadores útiles.

2.5. miR-126 y miR-375 en diabetes tipo 2

El miR-126 (también llamado angiomiR-126 por su relación con el sistema vascular) se expresa en las células endoteliales (Cavarretta, Chiariello, & Condorelli, 2013) facilitando la angiogénesis y regulando la función de las células endoteliales (de Boer *et al.*, 2013). Se ha encontrado que el nivel de expresión de miR-126 en plasma es menor en pacientes con DT2 generando un efecto en la señalización del factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF). Estas diferencias se replicaron en ratones hiperglicémicos, donde los niveles de expresión de miR-126 en los cuerpos apoptóticos endoteliales disminuye frente a una alta concentración de glucosa (Zampetaki *et al.*, 2010). Zampetaki *et al.*, 2010, llevaron a cabo uno de los primeros estudios que evaluó perfiles de expresión de miRNAs en plasma en una muestra de 822 pacientes con DT2, además en este estudio se llevó a cabo un seguimiento de individuos que presentaron niveles normales de glucosa basal y que, en los siguientes diez años, desarrollaron DT2. Los niveles de expresión de miR-126 se encontraron alterados en estos pacientes mucho antes de la manifestación de la enfermedad. Zhang *et al.*, 2015, también reportaron el poder predictivo de miR-126 al realizar un seguimiento por dos años a individuos que presentaban una concentración de glucosa basal dentro del rango normal y que posteriormente desarrollan DT2. Por tanto, se encuentra una asociación entre el nivel de expresión de miR-126 y la DT2, así como una correlación indirecta entre miR-126 y la concentración de glucosa en plasma.

En otro estudio, donde se llevó a cabo un análisis de los transcriptos de miR-126 obtenidos a partir de suero de pacientes con DT2, se identificó una asociación entre el

estado diabético y la expresión de miR-126 (Liu *et al.*, 2014). Además, el estudio sugiere que miR-126 en suero podría utilizarse para discriminar individuos con pre-diabetes de individuos sanos. Lui *et al.*, 2014 consideraron en estado de pre-diabetes a individuos con tolerancia a la glucosa alterada (TGA) y/o glucosa en ayuno alterada (GAA), este grupo mostró una diferencia significativa comparada con los individuos de los grupos control (individuos sanos) y DT2. Es importante mencionar que el grupo TGA/GAA llevó un programa de dieta y ejercicio físico por seis meses. Una vez finalizado, los participantes mostraron un incremento de los niveles de expresión de miR-126, lo que indicaría que a este nivel se puede controlar la progresión de las alteraciones metabólicas y evitar la manifestación de la DT2.

Otros estudios también han sugerido el uso de miR-126 como potencial predictor de la aparición de DT2, observándose una menor expresión de este miRNA antes de la manifestación de la enfermedad en ciudadanos de China (Zhang *et al.*, 2015), Italia (Zampetaki *et al.*, 2010) y Egipto (Rezk *et al.*, 2016). Asimismo, la disminución en la expresión de miR-126 se ha encontrado en pacientes con DT2 que desarrollaron complicaciones diabéticas macrovasculares y retinopatía diabética en comparación con pacientes sin complicaciones evidentes (Rezk *et al.*, 2016).

Por otro lado, dentro de los miRNAs mejor estudiados se encuentra miR-375 el cual se expresa en los islotes de células β así como en la glándula pituitaria, glándula suprarrenal, tiroides, hipófisis, pulmones y tracto gastrointestinal (Eliasson, 2017). Estudios en ratones *knockout* (375KO) demostraron que la ausencia de miR-375 no solo influye en la masa de células β sino también en la masa de células α que median la regulación de genes involucrados en el crecimiento y proliferación celular (Poy *et al.*, 2009).

En la organogénesis del páncreas el nivel de expresión de miR-375 aumenta al mismo tiempo que lo hace la transcripción del gen de la insulina, de esta forma miR-375 tendría un papel regulador en el desarrollo pancreático (Li, 2014). Además, se ha

observado que miR-375 es esencial para la homeostasis de la glucosa (Higuchi *et al.*, 2015).

De acuerdo con la investigación de Higuchi *et al.*, 2015, donde obtuvieron perfiles de expresión de miRNAs en varios tejidos de ratones que fueron sometidos a una dieta alta en colesterol, mostraron una alta expresión de los miRNAs evaluados en los islotes pancreáticos a diferencia de otros tejidos. Además, el nivel de expresión de miR-375 no mostró diferencias entre el grupo control y el grupo sometido a la dieta alta en colesterol. Sin embargo, sí se observó un aumento del nivel de expresión de miR-375 en el tejido adiposo pardo del grupo en estudio comparado al grupo control.

Investigaciones realizadas con muestras de suero evidencian un incremento en el nivel de expresión de miR-375 al comparar grupos de individuos con pre-diabetes y pacientes con DT2 con un grupo conformado por individuos con tolerancia normal a la glucosa e individuos sanos (Kong *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014; Higuchi *et al.*, 2015). Kong *et al.* 2011 fueron uno de los primeros en evaluar los perfiles de expresión de miRNAs en pacientes con DT2, tras su estudio manifiestan que un panel de miRNAs, que incluye a miR-375, permite clasificar correctamente a individuos con DT2 recién diagnosticada, individuos con pre-diabetes e individuos sanos.

miR-375 muestra asociación con DT2 independientemente de la edad, sexo, presión sanguínea, HBA1c, colesterol, triglicéridos y LDL, así como con la progresión de esta enfermedad (Al-Muhtaresh & Al-Kafaji, 2018). Este miRNA actúa como un regulador negativo de la secreción de insulina de modo que altos niveles de su expresión la suprimen, mientras que una baja expresión la potencia (Eliasson, 2017).

Por otro lado, también existen antecedentes que no evidencian diferencias en el nivel de expresión de miR-375 entre los grupos evaluados (Flowers *et al.*, 2015; Seyhan *et al.*, 2016). Seyhan *et al.*, 2016, no encuentran diferencias en el nivel de expresión de miR-375 entre grupos de individuos con DT2, con pre-diabetes e individuos control,

pero sí reporta una sobreexpresión de miR-375 en individuos con diabetes tipo 1 con respecto a los individuos control. En este mismo estudio, miR-126 mostró una ligera disminución en el nivel de expresión en individuos con pre-diabetes en comparación con individuos control.

En lo que va del año, el número de investigaciones indizadas por PubMed, usando las palabras clave “miRNA” AND “type 2 diabetes”, son más de 100 y alrededor de 400 en 2016 y 2017. Por lo mencionado anteriormente, es importante el estudio de estos marcadores en la población peruana así como evaluar su uso potencial como biomarcadores debido a que diferencias en la expresión génica han sido encontradas en diversas poblaciones y/o grupos étnicos (Chang *et al.*, 2014).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El nivel de expresión de miR-126 y/o miR-375 se asocia con el estado DT2 o pre-diabetes de manera individual y/o en interacción con factores de riesgo.

3.2. Objetivos

3.2.1. General

Determinar si la expresión de miR-126 y/o miR-375 puede ser usada como biomarcador de DT2 y/o estado pre-diabetes de manera individual y/o en interacción con factores de riesgo.

3.2.2. Específicos

- Cuantificar la expresión de miR-126 y miR-375 en individuos diagnosticados con DT2, pre-diabéticos e individuos sanos en la población peruana.
- Comparar la expresión de miR-126 y miR-375 en individuos diagnosticados con DT2, pre-diabéticos e individuos sanos en población peruana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Grupos de estudio y material biológico

4.1.1. Características de los grupos de estudio

El grupo de estudio estuvo conformado por un total de 46 individuos, incluidos 17 individuos recién diagnosticados con DT2, 13 individuos con pre-diabetes y 16 individuos sanos de la Unidad de Endocrinología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza, provincia de Lima. En todos los casos se les proporcionó información detallada referente a la investigación y se les solicitó la firma del consentimiento informado. Seguidamente se procedió a la toma de muestra de sangre periférica y llenado de la ficha de captación de datos.

4.1.1.1. Pacientes con diabetes tipo 2

Criterios de Inclusión

- Consentimiento informado y encuesta.
- Pacientes con IMC < 34.9 y reciente diagnóstico de DT2 con un tiempo no mayor a 3 meses.
- Pacientes cuya edad de diagnóstico fluctúa entre 30 y 65 años.
- Pacientes que no han recibido ningún tratamiento contra la enfermedad o dejaron de recibirla en por lo menos seis meses previos a la toma de muestra.

Criterios de exclusión

- Pacientes que hayan desarrollado cáncer, enfermedades cardiovasculares, nefropatía u otras enfermedades crónicas (Kong *et al.*, 2011; Rezk *et al.*, 2016., 2016; Yan *et al.*, 2016).
- Pacientes con diagnóstico de MODY o diabetes tipo 1.

4.1.1.2. Individuos con pre-diabetes

Criterios de Inclusión

- Consentimiento informado y encuesta.
- Individuos con $IMC \leq 29.9$ sin diagnóstico de diabetes tipo 2.
- Individuos cuya edad fluctúa entre 30 y 65 años.
- Individuos con niveles de glucosa en sangre 100 mg/dL a 125 mg/dL y HbA1c entre 5.7% a 6.4 %.

Criterios de exclusión

Pacientes que hayan desarrollado cáncer u otras enfermedades crónicas (Kong et al., 2011; Rezk *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2016).

4.1.1.3. Control

Criterios de inclusión

- Consentimiento informado y encuesta.
- Individuos sin diagnóstico de DT2.
- Individuos sin antecedentes familiares de DT2.
- Individuos cuya edad fluctúa entre 30 y 65 años.
- Individuos con niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en rango considerado normal y que no presenten obesidad ($18.5 \leq IMC \leq 29.9$).

4.2 Muestra biológica

La toma de muestra fue colectada tras un ayuno de aproximadamente 8 horas. La muestra consistió en 3 mL de sangre periférica colectada por venopunción empleando el sistema Vacutainer®. Para ello se utilizó un tubo al vacío de polipropileno sin anticoagulante de 6 mL de capacidad. Las muestras fueron transportadas asegurando una cadena de frío desde el hospital al laboratorio.

El diagnóstico de DT2 fue confirmado mediante el examen de hemoglobina glicosilada (HbA1c) como recomienda la Asociación Americana de Diabetes (Care, 2017).

4.3 Obtención de suero

Para una coagulación completa, los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min. La separación del suero se llevó a cabo mediante centrifugación a 2500 rpm por 10 min, la fase superior (suero) se transfirió a un tubo y se centrifugó a 13 053 rpm durante 10 min para descartar los desechos celulares adicionales y minimizar la contaminación de los ácidos nucleicos libres derivados de las células sanguíneas dañados. Posterior a la centrifugación el volumen de suero se alicuotó y almacenó a -20 °C. La obtención de suero se llevó a cabo después de 2 a 6 horas posterior a la toma de muestra para realizar el procedimiento de extracción el mismo día.

4.4. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total se utilizó el kit comercial “miRNeasy Mini Kit” (Qiagen), siguiendo la recomendación del fabricante. El principio de extracción del kit consiste en una lisis por tiocianato de guanidina - fenol y purificación mediante membranas de sílice. El RNA purificado se almacenó a -20 °C hasta el momento en el que se llevó a cabo la síntesis de cDNA.

4.5. Diseño de cebadores

Se utilizó el software miRprimer (Busk, 2014) que permite el diseño de cebadores específicos para miRNAs a ser amplificados mediante RT-qPCR (Figura 2). Este método considera la secuencia del miRNA maduro como molde. Para el *forward* (cebador F) se toma de 12 nt a 18 nt de extremo 5' del miRNA que se estabiliza al agregar G, A, C, G, C en ese orden hasta alcanzar una temperatura de fusión (T_m) de 59 °C. Para el *reverse* (cebador R) se toma de 3 nt a 8 nt del miRNA en el extremo 3' del miRNA, se añade 15 residuos de timina y se estabiliza con los residuos de nucleótidos mencionados anteriormente para alcanzar una T_m de 59 °C. También se asigna una puntuación a la evaluación de una serie de parámetros como la longitud específica del miRNA, formación de estructuras secundarias y tendencia a formar dímeros una vez asignados los posibles pares de cebadores.

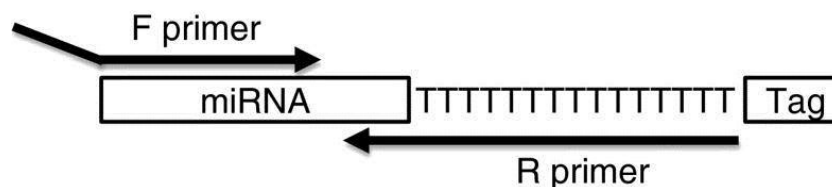


Figura 2. Ubicación de los cebadores para RT-qPCR específico de miRNA.

La secuencia del cebador *forward* (cebador F) es entre 12 nt a 18 nt de la secuencia del miRNA y puede incluir una etiqueta en el extremo 5'. El cebador *reverse* (cebador R) es complementario entre 3 nt a 8 nt del microRNA, seguido de 15 residuos de T y una cola de longitud variable. Los 15 residuos de T y la cola son idénticas a la parte de la secuencia del cebador RT (Busk, 2014).

Tabla 1. Cebadores empleados en transcripción reversa y qPCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')
RT-primer	(F) CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTVN
hsa-miR-126-3p	(F) GCAGTCGTACCGTGAGT
	(R) TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCA
hsa-miR-375	(F) AGTTTGTTTCGTTCCGGCTC
	(R) GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTCAC

(F) Forward
(R) Reverse

Tabla 2. miRNAs sintéticos empleados para generar la curva estándar

Nombre	Secuencias (5' → 3')
hsa-miR-126-synt	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGCATGGCACTCATTATTACGC
hsa-miR-375-synt	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAAACAAGCAAGCCGAGCGCACT

4.6. Poliadenilación y transcripción reversa

A partir del RNA aislado, se procedió a la poliadenilación y transcripción reversa (Figura 3). Para esta reacción se empleó la enzima polimerasa poly(A) (New England Biolabs) y la enzima transcriptasa reversa M-MuLV Reverse Transcriptase (Invitrogen).

El *master mix* consistió de 1 µL 10X de Buffer de reacción de la polimerasa poly(A) de *Escherichia coli.*, 1 µL de ATP (1mM), 1 µL de cebador RT (10 µM), 1 µL mix de dNTP (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP), 0,5 µL (200 U/µL) de transcriptasa reversa M-MuLV, 0,2 µL polimerasa poly(A) de *Escherichia coli.* 5 000 U/mL, se añade la muestra de RNA, y se completa con agua libre de RNasa hasta un volumen final de 10 µL. Esta mezcla se incubó a 42 °C por 1 h, luego a 95 °C por 5 minutos. El cDNA resultante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

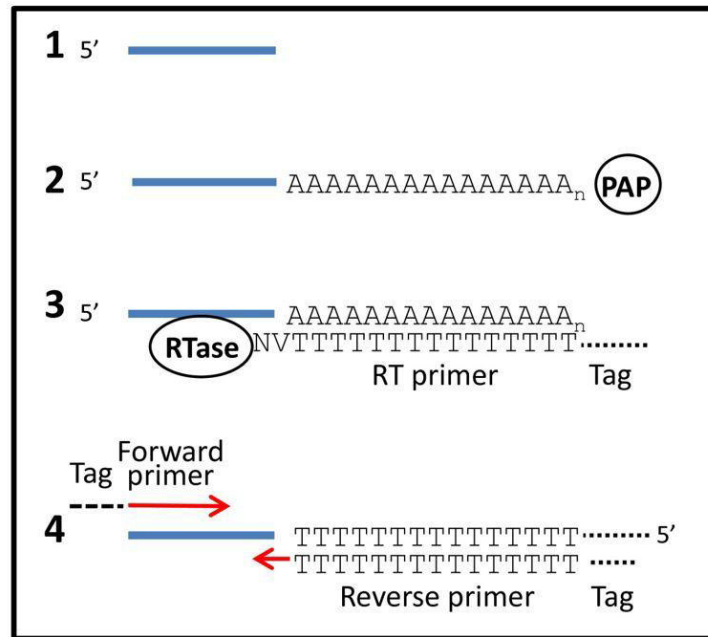


Figura 3. Poliadenilación y transcripción reversa.

(1) Comienza con el RNA purificado que contiene al miRNA. (2) Se agrega la cola poli (A) con la enzima polimerasa poli (A) (PAP). (3) La síntesis de cADN con transcriptasa reversa (RTasa) y un cebador de poli (T) anclado. (4) Finalmente, se realiza la PCR con dos cebadores (Modificado de Balcells, Cirera, & Busk, 2011).

4.7 Curvas estándar en la cuantificación absoluta

Para cada marcador se calculó una curva estándar por la amplificación seriada de los miRNAs sintéticos (Tabla 2) utilizando diferentes concentraciones de cada miRNA sintético. Se graficó el valor del ciclo umbral (Ct) promedio para cada concentración de miRNA sintético versus el logaritmo de la concentración del miRNA sintético (Figura 4). A partir de ello se utilizó la curva que obtuvo una eficiencia cercana al 100%.

La eficiencia de amplificación se realizó para cada juego de cebadores, siendo EmiR-126= 2.0 y EmiR-375=2.03 (Figura 4).

La amplificación específica de los cebadores se confirma con la presencia de un solo pico en la curva generada por los cebadores (Figura 12). El ciclo a partir del cual se detecta el producto amplificado (Ct) fue considerado para un Ct < 37.

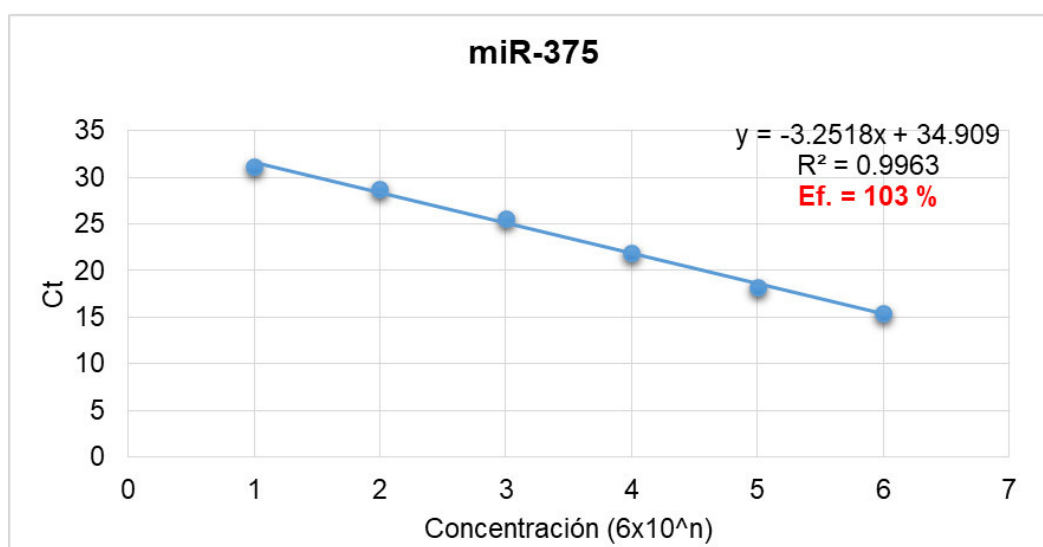
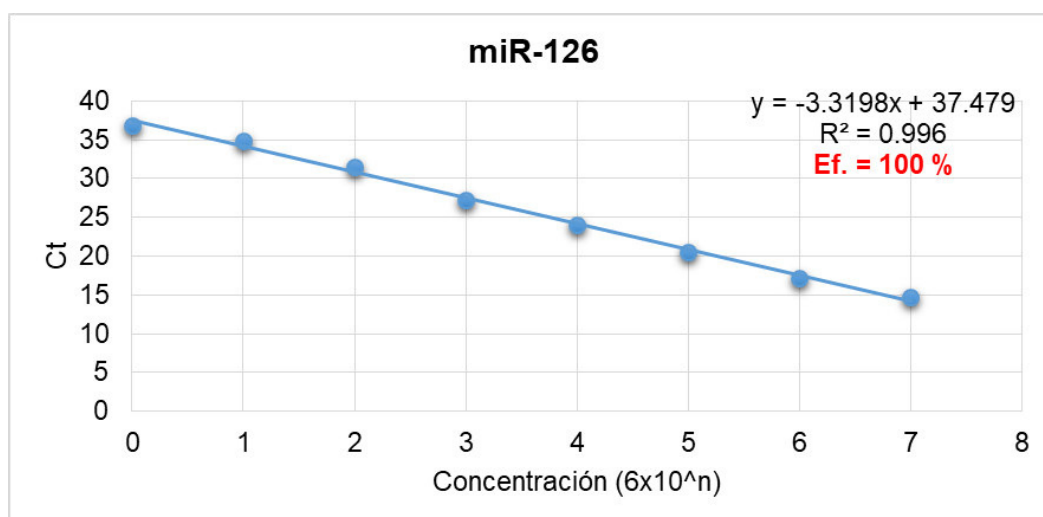


Figura 4. Eficiencia de amplificación de miR-126 y miR-375.

Las gráficas muestran los Ct vs la concentración del número de copias del miRNA sintético. La curva estándar se realizó mediante una dilución seriada del miRNA sintético.

4.8. PCR cuantitativo

El método consiste en realizar un PCR específico para miRNAs (Bacells *et al.*, 2011) que permite determinar, por cuantificación absoluta, el nivel de expresión de los miRNAs evaluados en los tres grupos de estudio (control, pre-diabetes y DT2).

Para el análisis de la expresión de los miRNAs se usaron los cebadores indicados anteriormente (Tabla 1), asimismo se usó el kit KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems), con modificación de protocolo del fabricante como se detalla a continuación. Se utilizó 5 µL de *master mix*, 0,2 µL de cada cebador, 0,2 µL (ROX) y 3 µL de cADN para un volumen de reacción de 10 µL. Los perfiles de expresión de los miRNAs se obtuvieron mediante reacción de amplificación llevada a cabo en el equipo StepOne Plus Real Time System (AB). La eficiencia de la amplificación se calculó para cada juego de cebadores por medio de curvas estándar de los miRNAs sintéticos. Las condiciones de la PCR fueron: inicio con 3 min a 95 °C, 10 s de 40 °C a 95 °C y 1 min a 60 °C. Se realizó la curva de disociación al final de cada corrida dentro del rango de temperaturas de 60 °C a 85 °C, aumentado 0.3 °C por cada segundo. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

4.9 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de la cuantificación por qPCR fueron colectados y analizados por el software StepOnePlus™ Software v2.3. La comparación de Ct se realizó para evaluar el nivel de expresión de los miRNAs mediante la cuantificación absoluta de cada uno de los marcadores.

La descripción de las variables así como la elección de las pruebas estadísticas se realizó en función de su naturaleza y distribución. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software estadístico R (R Core Team, 2018). Para determinar la distribución normal de los datos se usó la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables categóricas fueron comparadas mediante la prueba de Chi-cuadrado entre los tres grupos de

estudio. El análisis de diferencias de las variables cuantitativas entre los distintos grupos se realizó mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para las variables que presentan una distribución normal, caso contrario se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Para el análisis Post-hoc se utilizó la prueba Tukey o prueba de Dunn en función de la distribución de las variables. En ambos casos se usó la corrección por el método Bonferroni. La relación entre las variables numéricas se estudió elaborando gráficos de dispersión, líneas de tendencias y cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman mediante el paquete Psych de R (Revelle, 2018). El coeficiente de correlación de Pearson se usó cuando ambas variables siguieron una distribución normal, de lo contrario se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor a 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Grupos de estudio

Se evaluó un total de 46 muestras pertenecientes a los grupos control (n = 16), pre-diabetes (n = 13) y DT2 (n = 17). Cinco muestras no generaron datos del análisis de qPCR, fueron una muestra control y una del grupo DT2 para miR-126 y dos muestras en el grupo pre-diabetes y una en el grupo DT2 para el marcador miR-375. Por lo tanto, no se les incluyó en el análisis del nivel de expresión de miRNAs.

5.2. Características antropométricas y bioquímicas

Las características antropométricas y bioquímicas de los tres grupos de estudio, control, pre-diabetes y DT2 se describen en la Tabla 3.

La comparación entre los tres grupos pone en evidencia la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las variables índice de masa corporal, circunferencia abdominal, glucosa, HbA1c, HDL, VLDL y triglicéridos de los grupos evaluados (control, pre-diabetes y DT2) (Tabla 3 y Figura 5 - 10).

Tabla 3. Descripción de las variables antropométricas y bioquímicas entre los grupos de estudio.

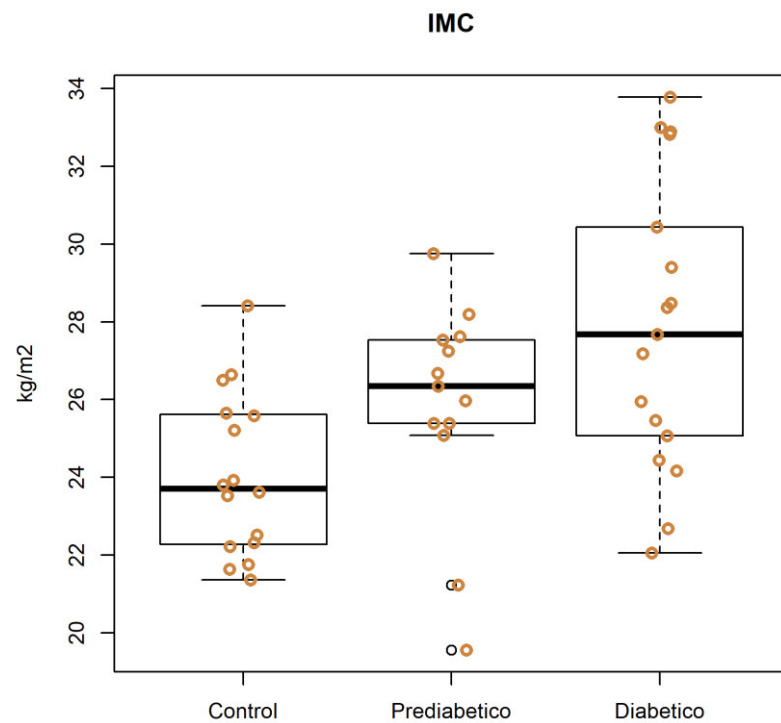
Características	Control (Media ± SD)	Pre-diabetes (Media ± SD)	DT2 (Media ± SD)	P-value
Sexo (masculino/femenino)	16 (8/8)	13 (5/8)	17 (9/8)	0.095 ^a
Edad (años)	45.19 ± 10.81	45.69 ± 9.85	49.88 ± 6.67	0.289 ^b
IMC (kg/m²)	24.04 ± 2.09	25.85 ± 2.76	27.88 ± 3.75	0.003 ^b
Circunferencia abdominal (cm)	87.31 ± 11.85	90.15 ± 8.49	97.00 ± 8.54	0.021 ^b
PAS (mmHg)	122.75 ± 0.55	121.77 ± 16.94	123.41 ± 13.26	0.948 ^b
PAD (mmHg)	78.13 ± 5.26	80.08 ± 10.68	82.65 ± 14.00	0.482 ^b
Glucosa (mg/dL)	95.94 ± 8.69	99.77 ± 13.92	172.12 ± 75.11	2.6e-05 ^b
HbA1c (%)	5.31 ± 0.27	5.82 ± 0.16	9.16 ± 2.69	2.6e-08 ^c
Colesterol total (mg/dL)	178.34 ± 23.86	173.32 ± 25.56	198.52 ± 40.53	0.071 ^b
HDL - Colesterol (mg/dL)	61.53 ± 24.82	24.82 ± 4.50	48.55 ± 6.95	0.001 ^c
LDL - Colesterol (mg/dL)	95.50 ± 21.60	85.43 ± 23.63	112.58 ± 42.13	0.065 ^b
VLDL - Colesterol (mg/dL)	27.60 ± 5.94	35.63 ± 17.34	38.41 ± 12.25	0.044 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	124.71 ± 28.61	164.00 ± 68.23	192.06 ± 61.25	0.002 ^c
miR-375 (x10³) (copias/μL de suero)	254.29 ± 230.58	563.74 ± 458.47	844.02 ± 954.99	0.143 ^c
miR- 126 (copias/μL de suero)	134.08 ± 167.8	124.83 ± 149.86	147.28 ± 173.26	0.728 ^c

SD: Desviación estándar

^a: Prueba de Chi cuadrado

^b: Prueba ANOVA

^c: Prueba Kruskal-Wallis.



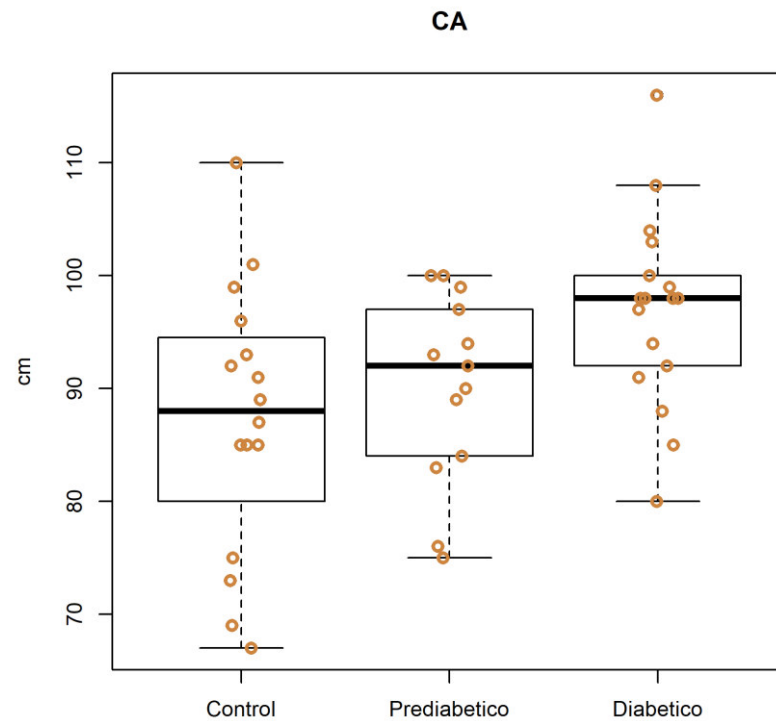
**Análisis de varianza (ANOVA) de una vía,
seguido de la prueba Post-hocTukeyHSD**

$F = 6.83$
 $gl = 2$
 $P\text{-value} = 0.003$

Grupos en pares	Límite inferior	Límite superior	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	-0.898	4.503	0.248
DT2 - Control	1.313	6.351	0.002
DT2 – Pre-diabetes	-0.635	4.694	0.166

Figura 5. Distribución de la variable Índice de Masa Corporal (IMC).

Se observa que el IMC incrementa desde el grupo control hasta el grupo DT2. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



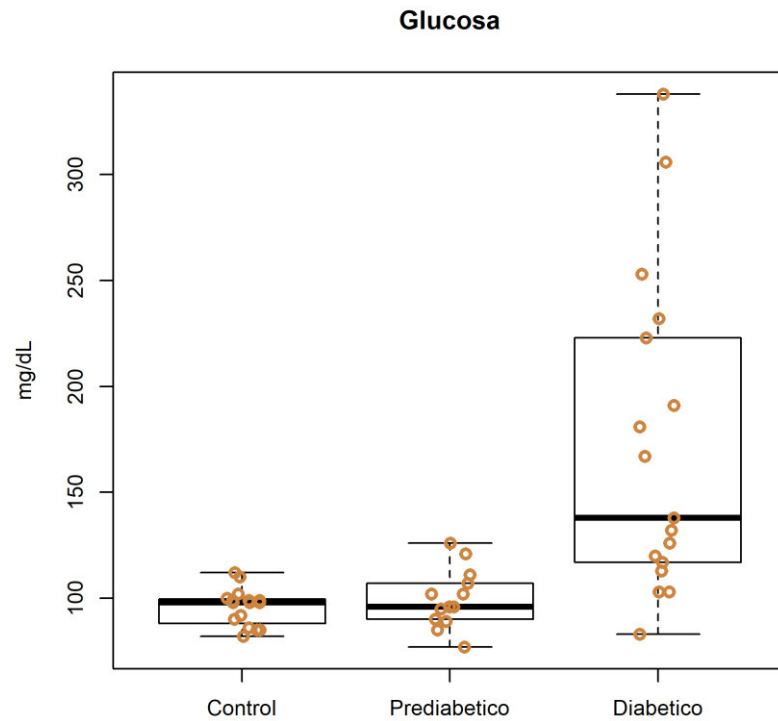
**Análisis de varianza (ANOVA) de una vía,
seguido de la prueba Post-hocTukeyHSD**

$F = 4.24$
 $gl = 2$
 $P\text{-value} = 0.021$

Grupos en pares	Límite inferior	Límite superior	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	-6.051	11.734	0.720
DT2 - Control	1.392	17.983	0.019
DT2 – Pre-diabetes	-1.929	15.621	0.153

Figura 6. Distribución de la variable Circunferencia Abdominal (CA).

Se observa que el CA incrementa desde el grupo control hasta el grupo DT2. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



**Análisis de varianza (ANOVA) de una vía,
seguido de la prueba Post-hocTukeyHSD**

$F = 13.656$

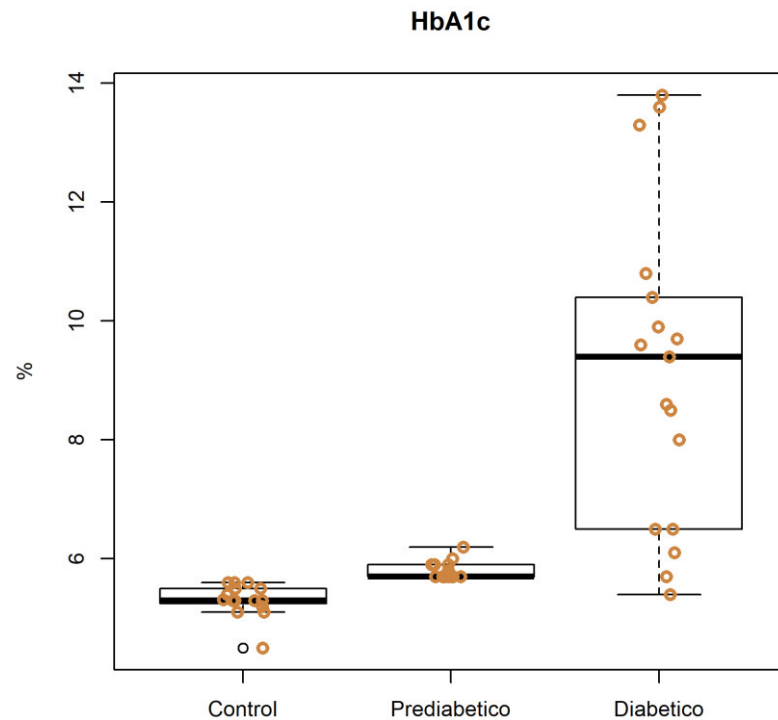
$gl = 2$

$P\text{-value} = 2.562e-05$

Grupos en pares	Límite inferior	Límite superior	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	-38.485	46.148	0.974
DT2 - Control	36.706	115.654	0.00008
DT2 – Pre-diabetes	30.594	114.103	0.0004

Figura 7. Distribución de la variable Glucosa.

Se observa que la glucosa presenta una concentración alta en el grupo DT2 a diferencia de los grupos Pre-diabetes y Control con concentraciones cercanas. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



Prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba Post-hoc Dunn, método Bonferroni

$$X^2 = 34.894$$

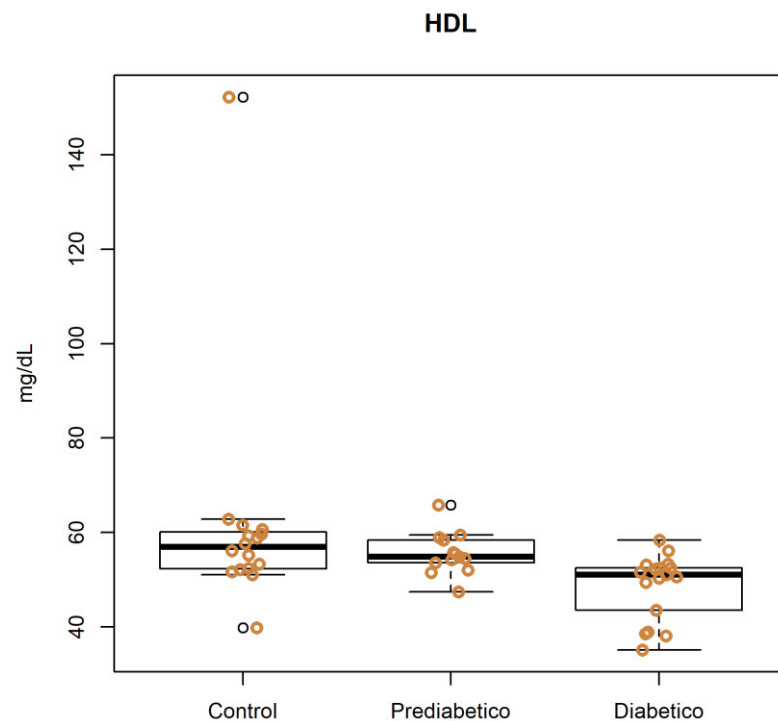
$$gl = 2$$

$$P\text{-value} = 2.647e-08$$

Grupos en pares	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	0.0021
DT2 - Control	0.00
DT2 – Pre-diabetes	0.03

Figura 8. Distribución de la variable Hemoglobina glicosilada (HbA1c).

Se observa que la HbA1c incrementa desde el grupo control hasta el grupo DT2, presentando el grupo DT2 valores elevados. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



Prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba Post-hoc Dunn, método Bonferroni

$$X^2 = 13.363$$

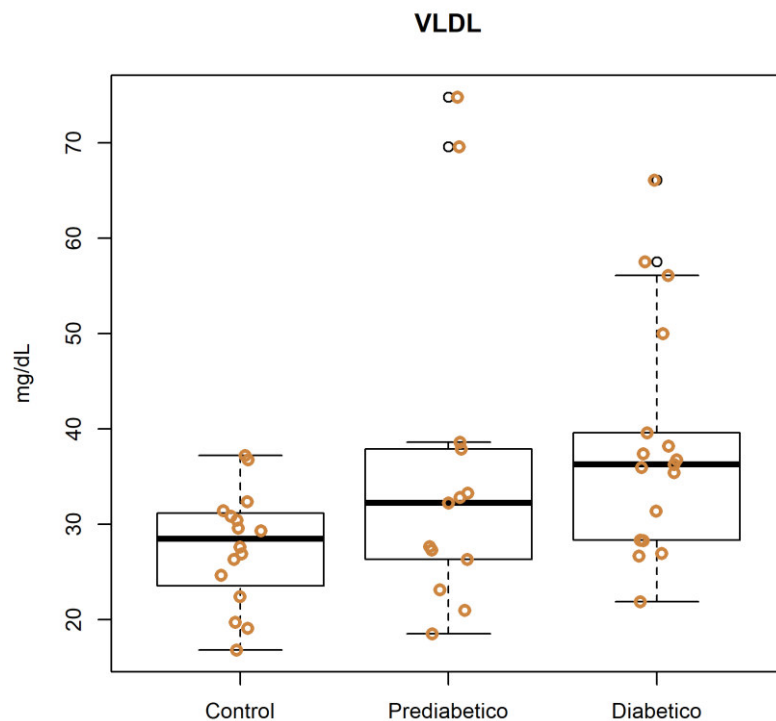
$$gl = 2$$

$$P\text{-value} = 0.0013$$

Grupos en pares	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	0.999
DT2 - Control	0.001
DT2 – Pre-diabetes	0.008

Figura 9. Distribución de la variable HDL.

Se observa que el colesterol HDL disminuye desde el grupo control hasta el grupo DT2. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



Prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba Post-hoc Dunn, método Bonferroni

$$X^2 = 7.398$$

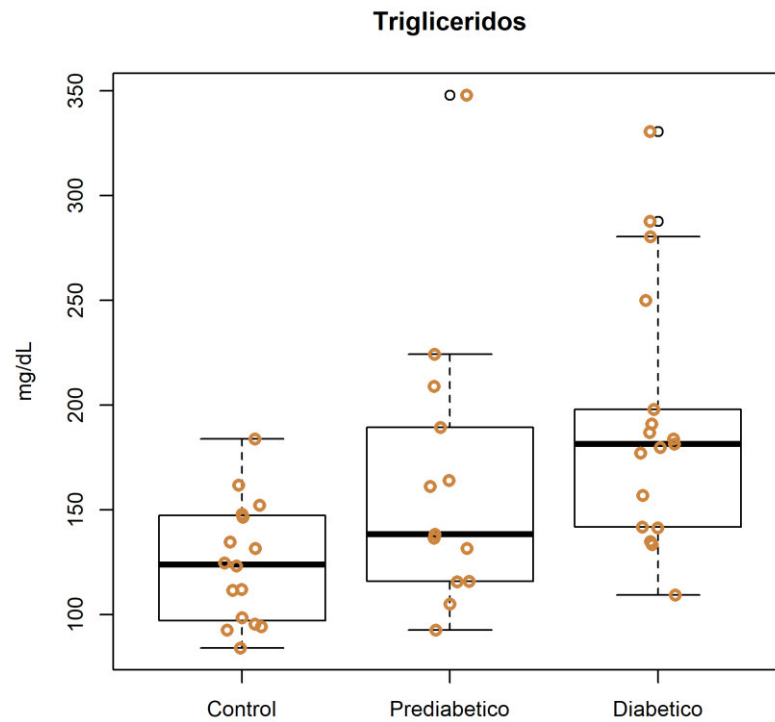
$$gl = 2$$

$$P\text{-value} = 0.025$$

Grupos en pares	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	0.261
DT2 - Control	0.010
DT2 – Pre-diabetes	0.350

Figura 10. Distribución de la variable VLDL.

Se observa que el colesterol VLDL incrementa desde el grupo control hasta el grupo DT2. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



Prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba Post-hoc Dunn, método Bonferroni

$$\chi^2 = 12.534$$

$$gl = 2$$

$$P\text{-value} = 0.0019$$

Grupos en pares	<i>P</i> - ajustado
Pre-diabetes - Control	0.104
DT2 - Control	0.0006
DT2 – Pre-diabetes	0.199

Figura 11. Distribución de la variable Triglicéridos.

Se observa que el triglicérido incrementa desde el grupo control hasta el grupo DT2. Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.

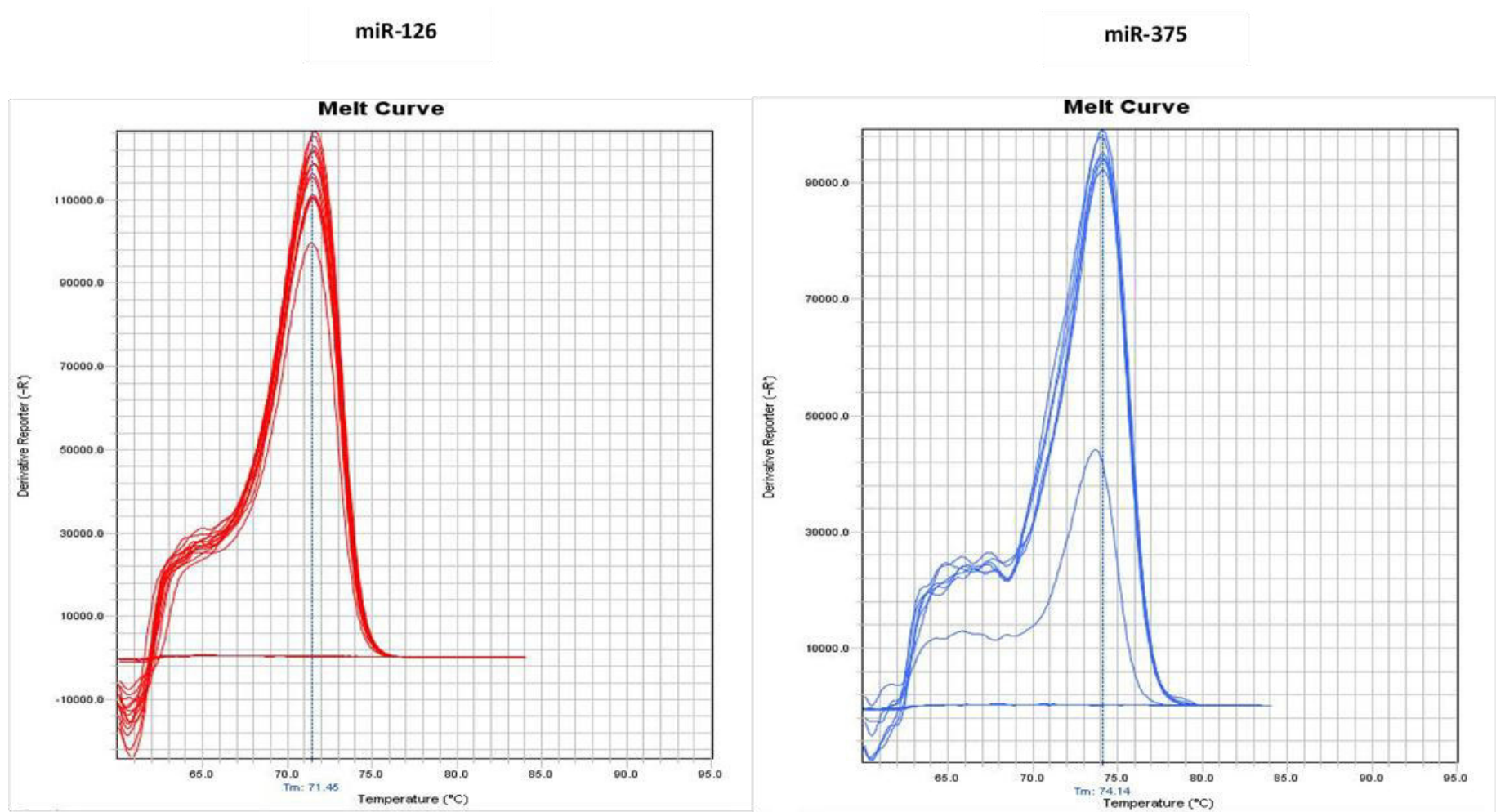


Figura 12. Curvas de disociación para determinar la amplificación específica de los cebadores para miR-126 y miR-375.

Fluorescencia (Derivate Reporter (-R)) vs Temperatura (°C) muestra un solo pico indicando la especificidad de los cebadores.

5.3. Perfiles de expresión

Los niveles de expresión de cada miRNA se expresan en número de copias de miRNA evaluado en un 1 μ L de suero.

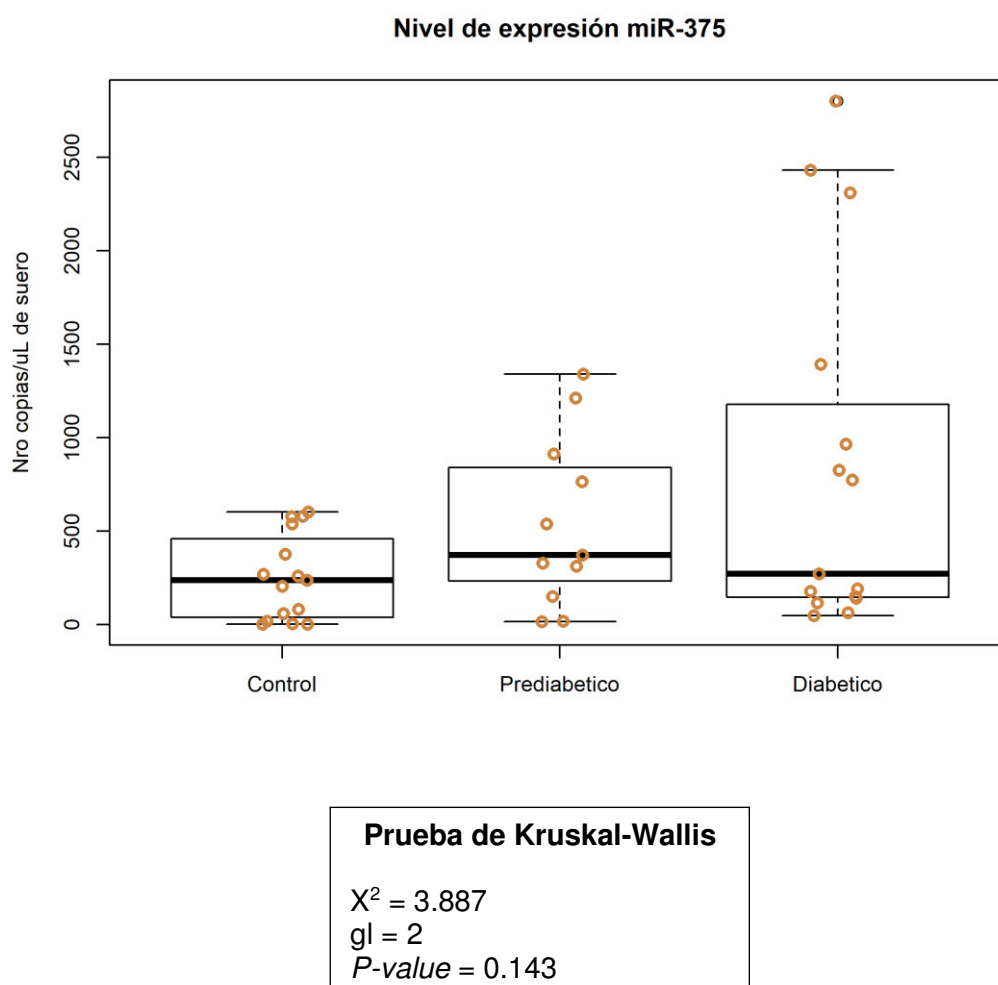
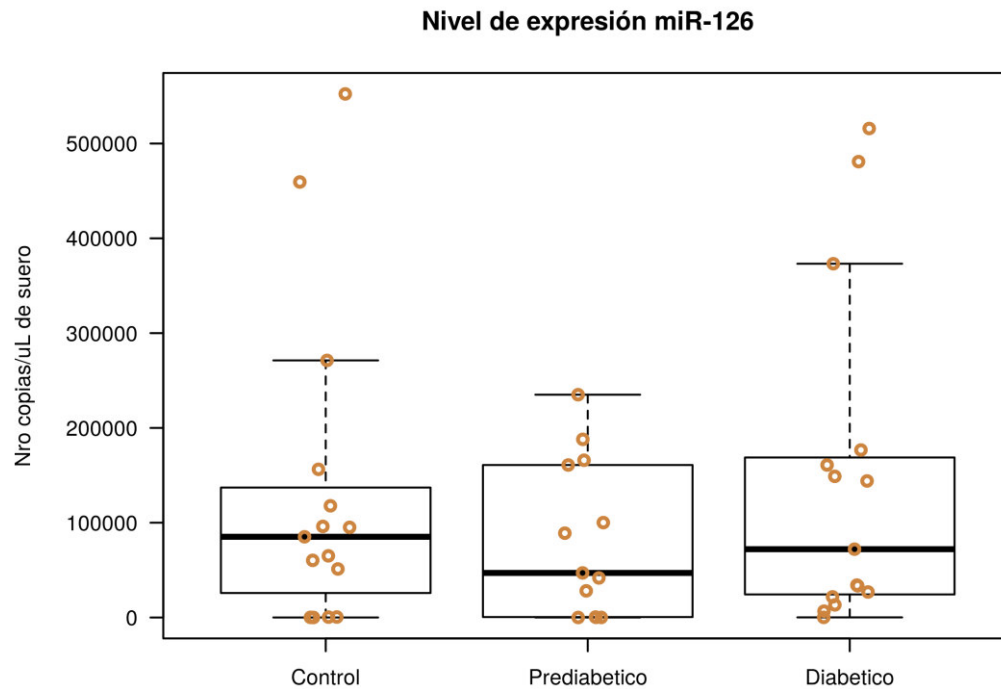


Figura 13. Nivel de expresión de miR-375

Se observa que la expresión de miR-375 presenta una tendencia a incrementar desde el grupo control hasta el grupo DT2. No hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.



Prueba de Kruskal-Wallis

$X^2 = 0.636$
 $gl = 2$
 $P\text{-value} = 0.728$

Figura 14. Nivel de expresión de miR-126

Se observa que la expresión de miR-126 presenta semejanzas en sus niveles de expresión desde el grupo control hasta el grupo DT2, con la presencia de ciertos valores atípicos. No hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Control, Pre-diabetes y DT2.

6. DISCUSIÓN

A pesar de existir marcadores biológicos que permiten diagnosticar la diabetes tipo 2 (DT2) y realizar un monitoreo de los niveles de azúcar en sangre de los pacientes, existen dos grandes deficiencias respecto a ello. Primero, cuando se diagnostica a un paciente con DT2 este ya presenta alteraciones metabólicas mucho antes del diagnóstico y por tanto resulta más difícil abordar la enfermedad ya establecida. Segundo, estos marcadores no permiten anticipar las complicaciones diabéticas que puede desarrollar el paciente. Por lo tanto, se necesita identificar marcadores específicos de DT2 que permitan detectar tempranamente el riesgo de desarrollo de esta enfermedad.

Los miRNAs, al estar involucrados en la regulación génica, tienden a variar sus niveles de expresión en respuesta a una alteración ocurrida en nuestro organismo, por ende, es posible cuantificar su expresión en individuos de los grupos control, pre-diabetes y DT2 generando perfiles de expresión que permiten la comparación entre estos grupos.

6.1 Factores de riesgo

La obesidad es el principal factor de riesgo de DT2, en la presente tesis este parámetro se mide con el índice de masa corporal (Figura 5); otro factor es el nivel de glucosa, evaluada aquí con la concentración de glucosa plasmática en ayunas (Figura 7) y la HbA1c (Figura 8); además de los factores no modificables como la presencia, o no, de antecedentes familiares (Anexo 1). Todas estas variables antes mencionadas, además de los cuantificadores del perfil lipídico (colesterol HDL, colesterol VLDL y triglicéridos), fueron significativamente diferentes entre los tres grupos (Tabla 3). Los individuos incluidos en este estudio presentan características similares a los individuos que forman parte de la investigación de Rezk *et al.*, 2016, por ejemplo, el promedio de edad (47 años) es el mismo en ambos estudios (Tabla 3). Con respecto a esta variable, en el Perú se ha observado una mayor incidencia de diabetes (23.1%) en

individuos con edades entre 45 y 64 años (Seclen *et al.*, 2017). Otros estudios incluyen individuos con un rango de edad ligeramente menor (50 - 60 años) (Zampetaki *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014). Dentro de los criterios de inclusión de la presente tesis se consideró la edad de 30 - 65 años (Tabla 3) que abarca el rango donde se encuentran el mayor número de pacientes recién diagnosticados con DT2 en la población peruana.

Por otro lado, la incidencia de obesidad varía entre las diferentes poblaciones evaluadas según la literatura internacional, sobre todo en los países asiáticos como China y Japón que es donde se han realizado la mayoría de estudios de perfiles de expresión en miRNAs circulantes.

Un aspecto interesante es que existen similitudes entre los resultados de las características antropométricas entre individuos de esta y otras investigaciones. El grado de obesidad es un factor de confusión clave cuando se evalúa el efecto de otras variables sobre el desarrollo de diabetes. En la presente tesis se consideró individuos con IMC < 34.9 dentro del grupo DT2; en este grupo, solo el 2.3% representa individuos con IMC > 30 del total de individuos evaluados (Anexo 1). Por ende, es importante notar que el índice de masa corporal de los participantes es similar al reportado en otros estudios previos. Además, se puede reducir el efecto de confusión por esta variable.

Considerando las otras variables, los niveles de glucosa (Figura 7 y 8) y de triglicéridos (Figura 11) también muestran similitud con lo reportado en otras poblaciones. Además, también existe concordancia con respecto a las diferencias entre grupos (Zampetaki *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014; Wang *et al.* 2014; Higuchi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Rezk *et al.*, 2016).

Otro aspecto interesante es la diferencia en el perfil lipídico entre los grupos control y DT2. Por una parte, se observa una disminución de los niveles de colesterol HDL en el

grupo DT2 (Figura 9), mientras que la concentración de colesterol VLDL y triglicéridos (Figura 10 y 11) aumenta en este mismo grupo. Las investigaciones consideradas aquí como referencias (Zampetaki *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Wang *et al.* 2014; Zhang *et al.*, 2015; Higuchi *et al.*, 2015; Rezk *et al.*, 2016) muestran resultados diferentes con respecto a las variables bioquímicas evaluadas a pesar de que incluyen individuos recién diagnosticados con DT2, como es el caso de la presente tesis. Por ejemplo, según los resultados de Rezk *et al.* 2016, los grupos evaluados muestran diferencias significativas solo en la variable colesterol HDL; Lui *et al.* 2014 no observaron diferencias en las variables del perfil lipídico en los grupos evaluados; mientras que Kong *et al.*, 2011, encontraron diferencias en la concentración de triglicéridos. Estas diferencias entre los estudios pueden explicarse en función de factores ambientales y/o genéticos ya que estos podrían afectar vías metabólicas en los individuos (Wu *et al.*, 2014; Liggi & Griffin, 2017). A la fecha los resultados son contradictorios entre estudios, por ejemplo, se observan resultados diferentes entre la población peruana y poblaciones de Asia y Europa. Estas diferencias, podrían explicarse por la alta incidencia de sobrepeso y obesidad que existe en la población peruana (Seclen *et al.*, 2017).

6.2 Cuantificación de miRNAs

Es importante mencionar que no existe un consenso con respecto a qué criterios se deben tomar en cuenta para el estudio de los niveles de expresión de los miRNAs circulantes, por ejemplo, los estudios de expresión de miRNAs se han reportado en plasma y en suero. Aquí, la extracción de miRNAs se llevó a cabo a partir de muestras de suero, tal como se reportó en la investigación llevada a cabo por Kong *et al.*, 2011. Dicha investigación fue una de las primeras en comparar perfiles de expresión de miRNAs circulantes. El método de extracción también es considerado un factor que puede generar discrepancias a la hora de realizar comparaciones, tal como lo menciona Chiang, 2014 donde un determinado kit de extracción de RNA muestra

productos de PCR cuantitativa en tiempo real con una mayor señal de expresión (fluorescencia detectada) en comparación con otros kits comerciales. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a excepción de algunos miRNAs. El uso de diferentes métodos de extracción se debe principalmente a los diferentes tipos de muestras, las condiciones de cada laboratorio y los factores asociados. Como lo son el volumen de suero, almacenamiento de la muestra, descongelamiento de la muestra, entre otros.

Por otro lado, el uso o no de controles endógenos como normalizadores (miRNAs utilizados para normalizar los datos resultantes de la cuantificación relativa) es otro aspecto que tampoco se encuentra claro. El uso de un control no adecuado podría introducir un sesgo significativo. En los últimos años se ha sugerido el uso de miRNAs cuya expresión se mantenga invariable, sin embargo, estos podrían no serlo en realidad (Liu *et al.*, 2014). Muchos grupos de investigación han evaluado distintos potenciales genes de referencia entre los grupos pacientes y control, estos normalizadores no solo son específicos de cada enfermedad, sino también específicos por tejido evaluado. Por este motivo no se ha llegado a un consenso entre los grupos de investigación, en consecuencia, existen diferencias entre los normalizadores utilizados en múltiples estudios. De hecho, las investigaciones previas, citadas en esta tesis, no muestran coincidencias con respecto a los normalizadores utilizados.

En investigaciones sobre expresión de miRNAs extraídos de suero y/o plasma, como ocurre en la presente tesis, el uso de normalizadores se encuentra muy limitado con respecto a investigaciones que utilizan tejidos (principalmente investigaciones sobre cáncer) en donde se ha sugerido el uso de miRNAs let-7a y miR-16 como normalizadores (Drobna *et al.*, 2018). Algunos autores, como Liu *et al.*, 2014, realizaron una normalización a partir del volumen inicial de suero empleado. En la presente tesis no se utilizó un control interno pero sí una cantidad idéntica de suero tal como mencionan Liu *et al.* 2014; además, se ha realizado una cuantificación absoluta

donde los resultados se expresan en número de copias de miRNA por cada microlitro de suero. El método utilizado emplea una curva estándar para comparar el nivel de expresión de los grupos evaluados. Es probable que, en los casos en los que no se logró detectar fluorescencia por PCR cuantitativa, la concentración de los miRNA se encuentre por debajo de un umbral, es decir, la no detección de la fluorescencia podría deberse a un bajo nivel de expresión del miRNA. Este efecto fue observado por Kong *et al.*, 2011 en la evaluación de un conjunto de miRNAs en el que 3% de sus muestras no mostró fluorescencia. En la presente tesis, este valor es de un 15.2% (46 muestras). Por tanto, esas muestras no fueron consideradas en el análisis de comparación del nivel de expresión de los miRNAs. Además, esta no detección podría estar relacionada con el momento en el que se desarrolla la enfermedad y el momento en el que se hace el diagnóstico al individuo. Así, ya que estos son momentos diferentes, es plausible suponer que los cambios metabólicos tendrían un efecto diferente en la expresión de miRNAs entre los individuos con un desarrollo reciente de DT2 en comparación con aquellos que tienen mayor tiempo viviendo con la enfermedad.

6.3 Expresión de miRNA-126 y miR-375

Sobre los resultados de expresión de los marcadores evaluados, los niveles de expresión de miR-375 muestran una tendencia a incrementar desde el grupo control hasta el grupo DT2 (Figura 13). No obstante, estas variaciones no son estadísticamente significativas. Los estudios reportados donde se evaluó el nivel de expresión del miR-375 circulante, tanto en muestras de suero y/o plasma, indican que hay una sobreexpresión de miR-375 en pacientes con DT2 comparada con individuos con tolerancia normal a la glucosa (individuos sanos) (Kong *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014; Higuchi *et al.*, 2015; Wang *et al.* 2014). miR-375 es un marcador clave en la homeostasis de glucosa, ya que regula la secreción de insulina a través de la

inhibición de la exocitosis. Esto ha sido demostrado tanto en cultivos celulares como en estudios con ratones obesos (Sun *et al.*, 2014; Wang, Chang, Li, Yin, & Sun, 2014).

Es importante mencionar que no todos los reportes muestran diferencias entre individuos con pre-diabetes comparados con individuos con tolerancia normal a la glucosa (individuos del grupo control en la presente tesis). En el estudio de Kong *et al.*, 2011 no se encontró diferencias entre los grupos mencionados pero si hubo diferencias entre individuos de los grupos control e individuos DT2 recién diagnosticados. Caso contrario es lo reportado por Wang *et al.*, 2014 donde se reporta una clara diferencia entre individuos con tolerancia a la glucosa alterada (individuos del grupo pre-diabetes en la presente tesis) y pacientes con DT2. Otro punto a tener en cuenta es el tamaño de muestra empleado en ambos estudios, Kong *et al.*, 2011 trabajaron con tres grupos de diecinueve individuos, tamaño de muestra similar a la presente tesis; en cambio, Wang *et al.*, 2014 trabajaron con grupos de 50 individuos en promedio por cada grupo. Otros estudios, como el de Higuchi *et al.*, 2015 y el de Sun *et al.*, 2014, solo comparan el nivel de expresión de miR-375 entre individuos con tolerancia normal a la glucosa e individuos con DT2 evidenciando la sobreexpresión del marcador miR-375 en el segundo grupo. En la presente tesis observamos que al comparar el grupo control, el grupo pre-diabetes y el grupo DT2 (Figura 13), no se evidencian diferencias estadísticas entre grupos, estando en concordancia con los resultados de Kong *et al.*, 2011.

Los resultados presentados en la presente tesis muestra que el nivel de expresión de miR-375 no cambia en el desarrollo al estado pre-diabético y empieza a variar al inicio del estado diabético, pues se observa una tendencia al aumento de su expresión (Figura 13). No obstante, aunque se observa una mayor dispersión en el grupo DT2, este efecto podría estar relacionado con la diferencia que existe entre la progresión de la enfermedad y el momento del diagnóstico. Por tanto, sería adecuado ampliar la investigación, y de tal forma que permita determinar la utilidad de este marcador.

A diferencia de lo observado en miR-375, el marcador miR-126 mostró un nivel de expresión similar entre los grupos evaluados (Figura 14) por lo que dificulta su empleo para discriminar los diferentes estados. Sin embargo, en la mayoría de estudios previos se reporta la reducción en los niveles de expresión de miR-126 en individuos susceptibles (individuos con TGA/GAA) y pacientes con diagnóstico de DT2 comparado con individuos con una tolerancia normal a la glucosa (Zhang *et al.*, 2015; Zampetaki *et al.*, 2010; Rezk *et al.*, 2016).

Este marcador juega un papel importante en la homeostasis del endotelio y la integridad celular (Zampetaki *et al.*, 2010), es por ello que se propone como potencial biomarcador de DT2. Incluso ha sido evaluado en pacientes con complicaciones diabéticas mostrando diferencias entre individuos con un reciente diagnóstico de DT2 y pacientes diabéticos con complicaciones macrovasculares y retinopatía (Rezk *et al.*, 2016).

En este estudio, el tamaño de muestra ha sido una limitación para obtener conclusiones sólidas para ambos miRNAs. Sin embargo, el marcador miR-375 ha mostrado información preliminar importante en el grupo DT2.

La presente tesis sienta las bases en la búsqueda de marcadores moleculares que detectan la variación en la expresión génica para la prevención de la diabetes tipo 2 en el Perú.

7. CONCLUSIONES

- No existen diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-126 y miR-375 entre individuos de los grupos DT2, pre-diabetes y control.
- Existe una tendencia de incremento en el nivel de expresión de miR-375 en el grupo DT2 comparado con el grupo control.
- Las variables consideradas factores de riesgo clásico muestran una clara diferencia entre los grupos control, pre-diabetes y diabetes tipo 2.

8. RECOMENDACIONES

- Contar con un protocolo de toma de muestra, transporte y almacenamiento que evite la posible contaminación de la muestra y degradación del RNA.
- Emplear un tamaño de muestra mayor.
- Usar controles endógenos que permitan normalizar la expresión basal de los miRNA.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, A., Stolk, R. P., & Bakker, S. J. L. (2014). Identification of relevant biomarkers for type 2 diabetes. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70005-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70005-1)
- Al-Muhtaresh, H. A., & Al-Kafaji, G. (2018). Evaluation of two-diabetes related microRNAs suitability as earlier blood biomarkers for detecting. *J Clin Med*. doi: 10.3390/jcm7020012.
- Bajan, S., & Hutvagner, G. (2014). Regulation of miRNA processing and miRNA mediated gene repression in cancer. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*. <https://doi.org/10.2174/2211536602666140110234046>
- Balcells, I., Cirera, S., & Busk, P. K. (2011). Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-70>
- Bernabé-Ortiz, A., Carrillo-Larco, R. M., Gilman, R. H., Miele, C. H., Checkley, W., Wells, J. C., ... Miranda, J. J. (2016). Geographical variation in the progression of type 2 diabetes in Peru: The CRONICAS Cohort Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.09.007>
- Boon, R. A., & Vickers, K. C. (2013). Intercellular transport of MicroRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300139>
- Busk, P. K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>
- Care, D. (2017). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>
- Cavarretta, E., Chiariello, G. A., & Condorelli, G. (2013). Platelets, endothelium, and circulating microRNA-126 as a prognostic biomarker in cardiovascular diseases: Per aspirin ad astra. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehd032>
- Chang, X., Li, S., Li, J., Yin, L., Zhou, T., Zhang, C., ... Sun, K. (2014). Ethnic differences in microRNA-375 expression level and DNA methylation status in type 2 diabetes of Han

- and Kazak populations. *Journal of Diabetes Research*.
<https://doi.org/10.1155/2014/761938>
- Chiang, V. S. C. (2014). Post- harvest consideration factors for microRNA research in cellular, tissue, serum and plasma samples. *Cell Biology International*.
<https://doi.org/10.1002/cbin.10346>
- de Boer, H. C., Van Solingen, C., Prins, J., Duijs, J. M. G. J., Huisman, M. V., Rabelink, T. J., & Van Zonneveld, A. J. (2013). Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi007>
- de Planell-Saguer, M., & Rodicio, M. C. (2013). Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clinical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.02.017>
- Dehwah, M. A. S., Xu, A., & Huang, Q. (2012). MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *Journal of Genetics and Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.11.007>
- Deiuliis, J. A. (2016). MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *International Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.170>
- Drobna, M., Szarzyńska-Zawadzka, B., Dąca-Roszak, P., Kosmalka, M., Jaksik, R., Witt, M., & Dawidowska, M. (2018). Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2858.
- Eliasson, L. (2017). The small RNA miR-375 – a pancreatic islet abundant miRNA with multiple roles in endocrine beta cell function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.043>
- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., & Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004>
- Feng, J., Xing, W., & Xie, L. (2016). Regulatory roles of microRNAs in diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17101729>

- Flowers, E., Aouizerat, B. E., Abbasi, F., Lamendola, C., Grove, K. M., Fukuoka, Y., & Reaven, G. M. (2015). Circulating microRNA-320a and microRNA-486 predict thiazolidinedione response: Moving towards precision health for diabetes prevention. *Metabolism: Clinical and Experimental*. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.05.013>
- Guay, C., & Regazzi, R. (2013). Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.86>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- He, Y., Ding, Y., Liang, B., Lin, J., Kim, T. K., Yu, H., ... Wang, K. (2017). A systematic study of dysregulated MicroRNA in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18030456>
- Higuchi, C., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Teshigawara, S., Kanzaki, M., Katayama, A., ... Wada, J. (2015). Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.12.003>
- International Diabetes Federation (IDF). (2015). IDF Diabetes Atlas 7th edition. *Idf.Org*. <https://doi.org/10.1289/image.ehp.v119.i03>
- International Diabetes Federation (IDF). (2017). *IDF Diabetes Atlas 8th edition*. *Idf.Org*. <https://doi.org/10.1289/image.ehp.v119.i03>
- Jagannathan, R., Buysschaert, M., Medina, J. L., Katz, K., Musleh, S., Dorcely, B., & Bergman, M. (2018). The 1-h post-load plasma glucose as a novel biomarker for diagnosing dysglycemia. *Acta Diabetologica*. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1105-3>
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., ... Zhao, L. (2011). Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetologica*. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0226-0>

- Lee, I., Ajay, S. S., Jong, I. Y., Hyun, S. K., Su, H. H., Nam, H. K., ... Athey, B. D. (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.089367.108>
- Li, X. (2014). MiR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.105>
- Liggi, S., & Griffin, J. L. (2017). Metabolomics applied to diabetes– lessons from human population studies. *The international journal of biochemistry & cell biology*.
- Liu, Y., Gao, G., Yang, C., Zhou, K., Shen, B., Liang, H., & Jiang, X. (2014). The role of circulating microRNA-126 (miR-126): A novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms150610567>
- Melo, C. A., & Melo, S. A. (2014). Biogenesis and physiology of micrornas. In *Non-Coding RNAs and Cancer*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8444-8_2
- Ministerio de Salud. (2015). Instituto Nacional de Salud emprende lucha contra la diabetes mellitus tipo 2 en población. 15-08-2018, de Ministerio de Salud del Perú Sitio web: <http://www.minsa.gob.pe/?op=51-a=16278>.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Müller, G. (2012). Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S32923>
- Park, N. J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B. S., Kastratovic, D. A., Abemayor, E., & Wong, D. T. (2009). Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0736>

- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., ... Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810550106>
- Raffort, J., Hinault, C., Dumortier, O., & Van Obberghen, E. (2015). Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3680-y>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Revelle, W. (2018) psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, <https://CRAN.R-project.org/package=psych> Version = 1.8.4.
- Rezk, N. A., Sabbah, N. A., & Saad, M. S. S. (2016). Role of microRNA 126 in screening, diagnosis, and prognosis of diabetic patients in Egypt. *IUBMB Life*.
- Sausa M. La diabetes está aumentando en la población de entre 30 y 50 años. [Actualizado 08 Nov 2014; último acceso 10 Ago 2018]. Recuperado de: <http://peru21.pe/actualidad/diabetes-millon-peruanos-padecen-y-2-millones-no-saben-que-tienen-2203432>.
- Sebastiani, G., Nigi, L., Grieco, G. E., Mancarella, F., Ventriglia, G., & Dotta, F. (2017). Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *Journal of Endocrinological Investigation*. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0611-4>
- Seclen, S. N., Rosas, M. E., Arias, A. J., Huayta, E., & Medina, C. A. (2015). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in Peru: report from PERUDIAB, a national urban population-based longitudinal study. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2015-000110>
- Seclen, S. N., Rosas, M. E., Arias, A. J., & Medina, C. A. (2017). Elevated incidence rates of diabetes in Peru: Report from PERUDIAB, a national urban population-based

- longitudinal study. *BMJ Open Diabetes Research and Care*.
<https://doi.org/10.1136/bmjdr-2017-000401>
- Seyhan, A. A., Nunez Lopez, Y. O., Xie, H., Yi, F., Mathews, C., Pasarica, M., & Pratley, R. E. (2016). Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: A pilot cross-sectional study. *Scientific Reports*.
<https://doi.org/10.1038/srep31479>
- Sun, K., Chang, X., Yin, L., Li, J., Zhou, T., Zhang, C., & Chen, X. (2014). Expression and DNA methylation status of microRNA-375 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1872>
- Villena, J. E. (2016). Epidemiología de la diabetes mellitus en el Perú. *Diagnostico*, 55(4).
- Wang, X., Chang, X., Li, J., Yin, L., & Sun, K. (2014). DNA methylation of microRNA-375 in impaired glucose tolerance. *Experimental and Therapeutic Medicine*.
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.1816>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., ... Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International journal of medical sciences*, 11(11), 1185.
- Xu, L. H., Guo, Y., Zhang, X. L., Chen, J. J., & Hu, S. Y. (2016). Blood-based circulating MicroRNAs are potential diagnostic biomarkers for leukemia: Result from a meta-analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000443046>
- Yan, S., Wang, T., Huang, S., Di, Y., Huang, Y., Liu, X., ... An, B. (2016). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes. *Acta Diabetologica*. <https://doi.org/10.1007/s00592-016-0837-1>
- Ying, S.-Y., Chang, D. C., & Lin, S.-L. (2013). The MicroRNA. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-083-0_1

- Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., ... Mayr, M. (2010). Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research*.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226357>
- Zhang, T., Li, L., Shang, Q., Lv, C. F., Wang, C. Y., & Su, B. (2015). Circulating miR-126 is a potential biomarker to predict the onset of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.017>
- Zubakov, D., Boersma, A. W. M., Choi, Y., Van Kuijk, P. F., Wiemer, E. A. C., & Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0402-3>

10. ANEXOS

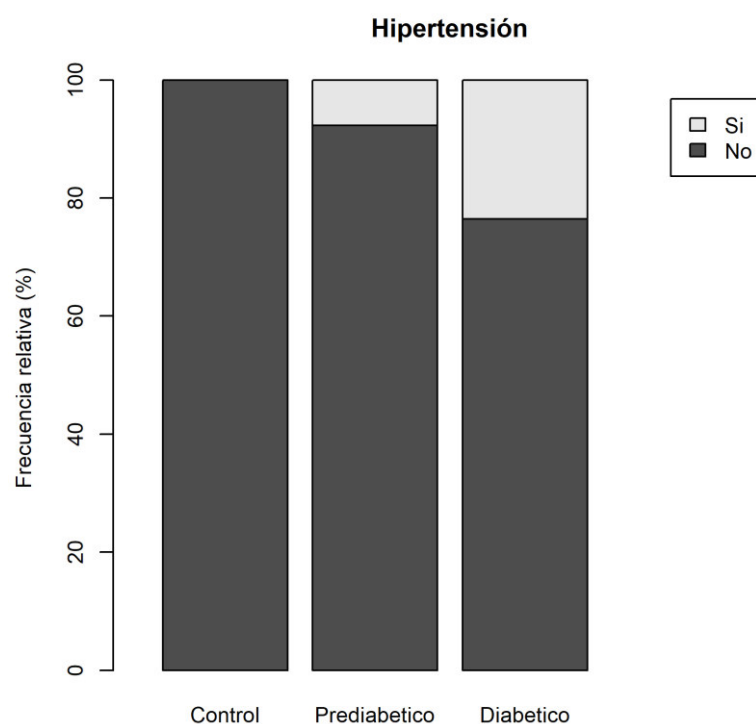
ANEXO 1. Características descriptivas de los grupos de estudio

Características	Control (%)	Prediabetes (%)	DT2 (%)
Sexo			
Mujeres	8 (50%)	8 (61.5%)	8 (47%)
Varones	8 (50%)	5 (38.5%)	9 (53%)
IMC (kg/m²)			
Normal (IMC<25)	10 (62.5%)	2 (15.4%)	4 (23.5%)
Sobrepeso (25<IMC≤29.9)	6 (37.5%)	11 (84.6%)	8 (47.1%)
Obesidad (30≥IMC)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (29.4%)
Al menos 30 minutos de actividad física			
Sí	6 (37.5%)	5 (38.5%)	7 (41.2%)
No	10 (62.5%)	8 (61.5%)	10 (58.8%)
Consumo frutas y/o verduras			
Todos los días	5 (31.6%)	4 (30.8%)	7 (41.2%)
No todos los días	11 (68.4%)	9 (69.2%)	10 (58.8%)
Hipertensión			
Sí	0 (0.0%)	1 (7.7%)	4 (23.5%)
No	16 (100%)	12 (92.3%)	13 (76.5%)
Antecedentes familiares directos			
Sí	1 (6.3%)	2 (15.4%)	6 (35.3%)
No	15 (93.7%)	11 (84.6%)	11 (64.7%)

El test estadístico empleado fue Chi-cuadrado χ^2 donde ($p < 0.001$).

Se encontraron diferencias significativas entre las variables hipertensión ($\chi^2 = 30.87$, $p = 1.98e-7$), antecedentes familiares de diabetes ($\chi^2 = 41.92$, $p = 7.88e-10$) e índice de masa corporal ($\chi^2 = 118.34$, $p = 1.207461e-24$) (Anexo 2-4). Los datos se observan en el Anexo 1. No hay diferencias estadísticas entre las variables sexo, actividad física (menos de 30 minutos diarios) y consumo de frutas y/o verduras.

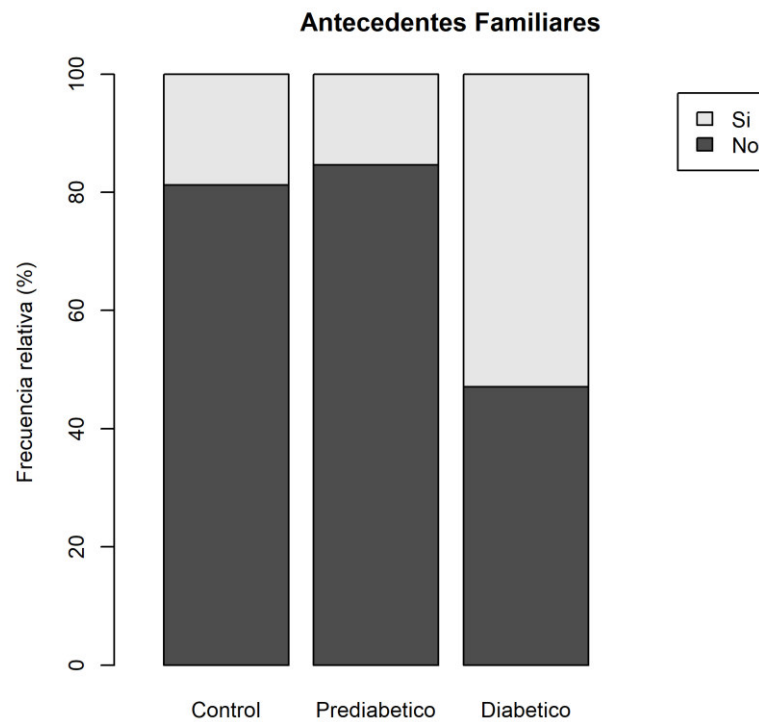
ANEXO 2. Frecuencia relativa de individuos para la variable hipertensión



Prueba de Chi-cuadrado

$\chi^2 = 30.87$
 $gl = 2$
 $P\text{-value} = 1.98e-7$

ANEXO 3. Frecuencia relativa de individuos para la variable Antecedente Familiares



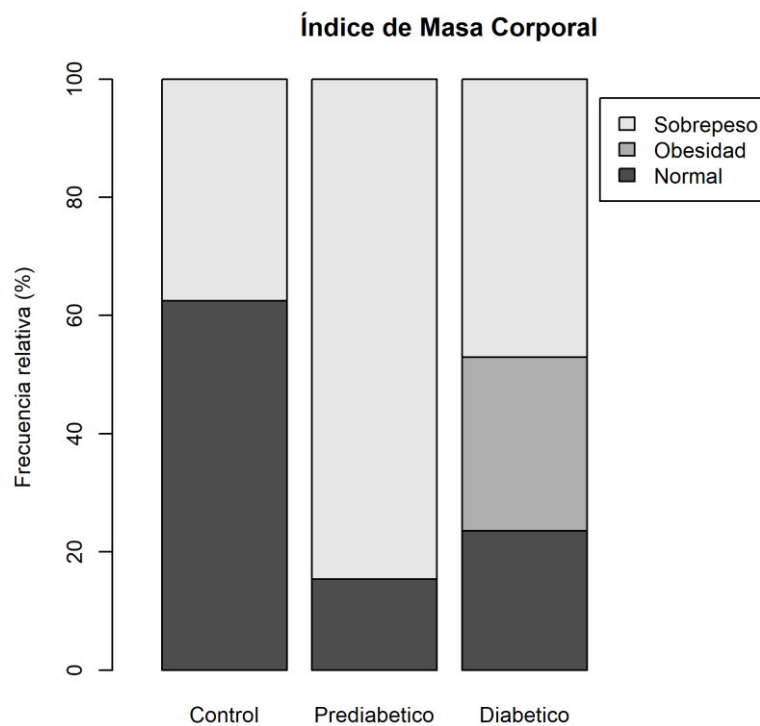
Prueba de Chi-cuadrado

$$X^2 = 41.92$$

$$gl = 2$$

$$P\text{-value} = 7.88e-10$$

ANEXO 4. Frecuencia relativa de individuos para la variable Índice de Masa Corporal



Prueba de Chi-cuadrado

$$X^2 = 118.34$$

$$gl = 2$$

$$P\text{-value} = < 2.2e-16$$

ANEXO 5. Ficha de datos

FICHA DE CAPTACION DE DATOS

Filiación:

Nombre y apellidos del paciente:

Edad:

Sexo:

Dirección:

Teléfono:

Antecedentes personales

Hipercolesterolemia	
Hipertensión	
Hipertrigliceridemia	
Proteína C reactiva	

Tratamiento Actual

Medicación antihipertensiva	Si	No
Otra:		

Hallazgos clínicos

Presión arterial:	Glucosa:
Circunferencia abdominal:	
Peso:	Talla:

Antecedentes

Presenta familiar(es) con diagnóstico de diabetes tipo 2:				Si	No
Fuma:	Si	No	Nº cigarrillos por día:		
Consume alcohol	Si	No	Nº vasos por semana:		



ANEXO 6. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: DESARROLLO DE UN KIT DIAGNÓSTICO PREVENTIVO DE DIABETES TIPO 2 EN LA POBLACIÓN PERUANA

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación científica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Estimado señor(a) la diabetes tipo 2 es una enfermedad muy común en nuestro país, se estima que aproximadamente 6 de cada 100 peruanos tienen este tipo de enfermedad y se ha observado que está en aumento en nuestro país. Esta enfermedad se caracteriza por el nivel alto de azúcar en la sangre que, al no ser diagnosticada y controlada a tiempo, puede presentar complicaciones serias en el corazón (como infartos), problemas de circulación en las extremidades inferiores (que pueden llevar al desarrollo de gangrena) así como en los ojos causando ceguera, derrames cerebrales entre otros. También se encuentra asociada a otras enfermedades como la obesidad e hipertensión arterial.

¿Por qué se está haciendo esta investigación?

Con esta investigación se pretende encontrar información genética cuyo uso, en conjunto con otros parámetros, permitirá una mejor forma de diagnóstico, tratamiento y prevención del desarrollo de esta enfermedad en la población peruana.

¿Quiénes participarán en este estudio?

Todas aquellas personas que de la Unidad de Endocrinología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza y de personas que no presenten esta enfermedad de la Unidad del Banco de Sangre del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

GRUPO PACIENTES:

Criterios de inclusión

1. Consentimiento informado y encuesta



2. Pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 2 con un tiempo no mayor a un mes.
3. Pacientes cuya edad de diagnóstico fluctúa entre 25 y 50 años.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que hayan desarrollado cáncer.
2. Pacientes diabéticos con familiares consanguíneos en primer grado que hayan desarrollado diabetes tipo 2.
3. Pacientes que hayan presentado una infección viral previa por virus de hepatitis B y/o VIH.
4. Pacientes con diagnóstico de MODY y diabetes tipo 1.

GRUPO CONTROL:

Criterios de inclusión

1. Consentimiento informado y encuesta.
2. Personas sin diagnóstico de diabetes tipo 2 con un tiempo no mayor a 2 años.
3. Personas cuya edad fluctúa entre 30 y 60 años.
4. Personas con niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en rango considerado normal y que no presenten obesidad.
5. Personas que no hayan desarrollado cáncer.
6. Personas sin antecedentes familiares (consanguíneos de primer grado) de diabetes tipo 2

¿En qué consiste su participación?

Deberá acercarse al Endocrinólogo que participa en el estudio, él le pedirá información, examinará y le tomará una muestra de sangre de la vena, en especial del brazo. La sangre nos servirá para obtener ADN a partir de linfocitos (células de la sangre).

¿Cuánto tiempo durará la toma de la muestra de sangre?

Solo requerimos su colaboración en una oportunidad, en una de las consultas, lapso que estimamos en 30 minutos. De aceptar usted se obtiene una muestra de sangre 3mL.

¿Cuáles son las ventajas de participar en este estudio?

Si los marcadores estudiados son diferentes entre pacientes y controles podrán ser usados como biomarcadores en el diagnóstico de la enfermedad en la población peruana.



¿Cuántas personas participan en esta investigación?

Participarán 200 pacientes y 240 controles personas que son pacientes del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

¿Es mi participación anónima? ¿Quién tendrá acceso a la información?

Se mantendrá el anonimato de los pacientes. Por lo tanto, la identidad e información individual no será revelada a entidades públicas o privadas de ningún tipo. La ficha de captación de datos y la muestra de los participantes será codificada y guardada en el Laboratorio de Genética de las Enfermedades Metabólicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

¿Qué desventaja puedo obtener de esta investigación?

No existe ninguna desventaja aparte del tiempo y el hincón para tomar la muestra de sangre, que a veces se acompaña de un moretón.

¿Cuándo se entregará los resultados?

Después de haber culminado con el proceso de toma de muestra, se continuará con el análisis molecular y genético. Culminado este proceso en 24 meses, se entregará los resultados al médico tratante para que de la información correspondiente a cada paciente.

¿Puedo retirarme del estudio?

Ciertamente, usted tiene garantizado el hecho de retirarse. Solo deberá poner en conocimiento del médico tratante su negativa a participar en el estudio. Esto puede ser en el lapso de un mes después de realizada la entrevista y la toma de muestra. No existirá ningún tipo de penalidad y garantizamos que continuará su atención rutinaria sin ninguna modificación.

¿Tendré que realizar algún pago por los exámenes y estudios?

No, usted no tendrá que realizar pago alguno, los costos de los exámenes están cubiertos por el presupuesto del presente proyecto.

¿Recibiré dinero por someterme a este estudio?

No se ha previsto pagos por participar en este estudio.

¿A quién puedo recurrir para preguntar acerca de una duda o para quejarme?

Podrá recurrir en cualquier momento y en principio a su médico tratante, luego podrá solicitar la información requerida por teléfono celular directamente al:

Dr. José Solís

Cel.: 997978618

Dr. Jorge Calderón

Cel.: 997127864

Dra. Mónica Paredes

Cel.: 993468506



Participación voluntaria:

Su participación en el estudio será totalmente voluntaria y si usted decide no participar, la atención médica no se verá afectada, teniendo los mismos derechos como paciente del hospital. La única diferencia es que no se le realizará la entrevista y no se le tomará la muestra para los análisis que tienen que ver estrictamente con este estudio.

¿Es posible que mi sangre obtenida de esta prueba pueda ser utilizada para el análisis genético de otras enfermedades?

Su muestra será archivada en un lugar seguro dentro del Laboratorio de Genética de las Enfermedades Metabólicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, en condiciones de total confidencialidad. De ninguna manera será manipulada para otros fines. El laboratorio se reserva el derecho de destruir la muestra después de un tiempo estimado como máximo de 20 años. Usted no necesariamente tiene que aceptar que su muestra de sangre sea utilizada para otros estudios que no sean específicamente el actual. Por lo cual le pedimos se sirva autorizar el uso de esta sangre para estudios futuros.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE:

"He leído y entendido la información prestada por mi médico tratante y escrita en este documento. También afirmo he tenido la oportunidad de hacer algunas preguntas y resolver algunas dudas. Por lo que acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación"

Nombre del paciente:

Documento de Identidad:

Rubrica:
digital

Huella



Nombre y apellidos del testigo:

Documento de Identidad:

Rubrica:

Lima, de del

ASÍ MISMO AUTORIZO A QUE SI FUERA CONVENIENTE MI SANGRE PUEDE SER UTILIZADA PARA EL ANALISIS DE OTRAS ENFERMEDADES HEREDITARIAS RELACIONADAS CON DIABETES TIPO 2.



27 FEB 2015

MINISTERIO DE SALUD
Hospital Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
Dr. JUAN LIMA VARGAS
Presidente del Comité Institucional
de Bioseguridad e Investigación

Nombre del paciente:

Documento de Identidad:

Rubrica: Huella digital



Nombre y apellidos del testigo:

Documento de Identidad:

Rubrica:

Lima, de, del,



27 FEB. 2015

MINISTERIO de Salud
Hospital Nacional "Ricardo León"
JUAN LEMA OCHOA
Presidente del Comité Interacción
de E-PS en la Región